F 1330

studii și cercetări de biochimie

1

TOMUL 12
1969

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA
St. cerc. biochim., tomul 12, nr. 1, p. 1—100, București, martie, 1969

COMITETUL DE REDACȚIE

Redactor responsabil:

ACADEMICIAN E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUȘANSCHI

Membri:

S. OERIU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; M. MEZINCESCU; I. VASILESCU; TR. RĂDULESCU; VICTORIA ALEXANDRESCU.

Secretar de redacție:

VICTOR GHEȚIE

Revista apare de 4 ori pe an.

Prețul unui abonament anual este de 80 lei.

În țară abonamentele se fac la oficiile poștale, agențiile poștale, factorii poștali și difuzorii voluntari din întreprinderi și instituții.

Orice comandă din străinătate (numere izolate sau abonamente) se fac prin CARTIMEX, Căsuța poștală 134 — 135, București, Republica Socialistă România, sau prin reprezentanții săi din străinătate.

Manuscrisele, cărțile și revistele pentru schimb, precum și orice corespondență se vor trimite pe adresa comitetului de redacție al revistei „Studii și cercetări de biochimie".

ADRESA REDACȚIEI:
București, *Str. Docenților nr. 20*
Sectorul I

E 1330

ACADEMIA REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

BIOCHIMIE

Tom. 12, nr. 1 1969

SUMAR

Pag.

E. MACOVSCHI, Acţiunea inhibitorilor metabolici asupra efluxului şi influxului ionilor de sodiu la axonii giganţi de *Sepia* (Consideraţii în lumina teoriei biostructurii) 5

E. MACOVSCHI, V. FRUNZETI, Eliberarea apei şi a altor substanţe din biostructura frunzelor de porumb sub acţiunea inhibitorilor metabolici . . . 19

V. ALEXANDRESCU, I. CĂLIN, Electroforeza şi imunoelectroforeza proteinelor din frunzele de porumb şi de alte cereale 27

D. COTARIU, M. ŞERBAN, Efectul corticosteroizilor asupra izoenzimelor lacticodehidrogenazei, malicodehidrogenazei şi aldolazei din musculatura striată 35

F. ENACHE, C. POPPA, Metodă pentru dozarea fierului eritrocitar 41

E. ILIESCU-MORUJU, Activitatea oxidazelor în cireşe în timpul creşterii şi maturării lor 47

V. MICUŞAN, Caracterizarea imunoelectroforetică a γ-globulinelor din serul sanguin şi laptele colostral bovin, izolate prin filtrare pe gel de dextran 53

A. MIHĂESCU, A. POPESCU, Variaţiile endosmozei iodului în colul uterin normal şi patologic 59

V. MOCANU, I. TĂNASE, Aspecte din biochimia scoarţei de plop infectate de *Dothichiza populea* Sacc. et Br. Nota II 63

C. MOTAŞ, V. GHEŢIE, Scindarea enzimatică a IgG de iepure de către formaţiunile subcelulare izolate din splina de iepure şi de şobolan 69

G. NEAMŢU, G. ILLYES, C. BODEA, Contribuţii la biosinteza carotinoidelor. IV. Asupra biosintezei carotinoidelor din *Aesculus hippocastanum* . . . 77

T. RUSÁNESCU, A. CURIGUŢ, I. KIŢULESCU, Modificări cantitative ale unor monozaharide tisulare sub influenţa histaminei, TPP şi piruvatului de sodiu 83

L. SCOLNIC, Unele aspecte ale exosmozei fosforului anorganic din muşchiul gastrocnemian de broască în narcoză 91

RECENZII 95

St. cerc. biochim., tomul 12, nr. 1, p. 1—100, Bucureşti, martie, 1969

ACADEMIA REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

BIOCHIMIE

Tomul 12 nr. 1 1969

CONTENTS

Page.

E. MACOVSCHI, The action of metabolic inhibitors upon sodium ion effluxes and influxes in giant axons from *Sepia*. (Some considerations in the light of the biostructure theory) 5
E. MACOVSCHI, V. FRUNZETI, The release of water and other substances from the biostructure of maize leaves under the action of metabolic inhibitors. 19
V. ALEXANDRESCU, I. CĂLIN, Electrophoresis and immunoelectrophoresis of proteins in leaves of maize and other cereals 27
D. COTARIU, M. ŞERBAN, The effect of corticosteroids upon lactic dehydrogenase, malic dehydrogenase and aldolase isoenzymes in skeletal muscles 35
F. ENACHE, C. POPPA, Assay of iron in erythrocytes 41
E. ILIESCU-MORUJU, The activity of oxydases in sweet cherries during growth and maturation. 47
V. MICUŞAN, Immunoelectrophoretical characterization of γ-globulins from bovine blood serum and colostral milk, isolated by dextran gel filtration 53
A. MIHĂESCU, A. POPESCU, Variations of iodine endosmosis in normal and pathological uterine cervix 59
V. MOCANU, I. TĂNASE, Some aspects of the bark biochemistry in Populus × euramericana infested by *Dothichiza populea* 63
C. MOTAŞ, V. GHEŢIE, Enzymatic splitting of rabbit IgG by sub-cellular fractions isolated from rabbit and rat spleen 69
G. NEAMŢU, G. ILLYES, C. BODEA, Contributions to the biosynthesis of carotenoids. IV. On the carotenoid biosynthesis in *Aesculus hippocastanum* 77
T. RUSĂNESCU, A. CURIGUŢ, I. KIŢULESCU, Quantitative modifications of some tissular monosaccharides under the action of histamine, TPP and sodium pyruvate 83
L. SCOLNIC, Some aspects of inorganic phosphate exosmosis of frog gastrocnemius muscles under anaesthesia 91
BOOK REVIEWS. 95

St. cerc. biochim., tomul 12, nr. 1, p. 1–100, Bucureşti, martie, 1969.

St. cerc. biochim., tomul 15, nr. 1, p. 1–100, Bucureşti, martie, 1972.

ACADEMIA REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

B I O C H I M I E

Tomul 15 nr. 1 1968

CONTENTS

E. MACOVSCHI. The action of streptococcal hemolysin upon sodium ion efflux from human erythrocytes and liposomes (Some considerations in the light of the phosphatidate theory) 5

E. MACOVSCHI, V. EMINESCU. The action of water and other substances from the phosphatidic of human leaves upon the action of phospholipase A on lecithin micelles 9

V. MACOVEANU, L. CAPLAN. Electrophoresis and immunoelectrophoresis of proteins in leaves of maize and other cereals 21

D. COTARLET, M. ZERBAN. The effect of corticosteroids upon lactic dehydrogenase activity in rat liver and kidney 33

E. ENACHE, C. POPA. Assay of iron in erythrocytes 41

E. IENESCU-MONCEA. The activity of oxydases in sweet cherry during growth and maturation 47

V. MACOVEANU. Immunoelectrophoretical characterization of Xylophilus ferrugineus bacteria 53

A. MIHAESCU, A. POPESCU. Antibodies of rabbit blood serum and colostrum milk against the O-polysaccharide of Escherichia coli 083 63

V. MOCANU, L. TANASE. Some aspects of the park phenomenon in Tetrahymena pyriformis cells 69

C. NOTAS, V. CHEPE. Enzymatic synthesis of maltose 1(6) p sup-cellular fractions isolated from maize and rat spleen 83

C. NEAGU, G. ITEANU, C. BODEA. Contributions to the physiology of carotenoids. IV. On the carotenoid pigments in yeasts (Rhodotorula rubra) 91

I. MOLNAREscu, A. CORNOIU, I. KIM-IESCU. Quantitative modifications of some tissular monosaccharides under the action of pirazinic TTP and sodium pyruvate 97

D. SCOPNIC. Some aspects of inorganic phosphate exchanges of the isolated mitochondria under anoxia 91

BOOK REVIEWS 99

ST. CERC. BIOCHIM., 12, 1, 5–18 (1969)

ACȚIUNEA INHIBITORILOR METABOLICI ASUPRA EFLUXULUI ȘI INFLUXULUI IONILOR DE SODIU LA AXONII GIGANȚI DE *SEPIA*

(Considerații în lumina teoriei biostructurii)

EUGEN MACOVSCHI

Rezumat. — Rezultatele experimentale obținute de A. L. Hodgkin și R. D. Keynes în cercetările lor referitoare la influența inhibitorilor metabolici asupra efluxului ionilor de sodiu din axonii giganți de *Sepia* au fost analizate de pe pozițiile teoriei biostructurii. S-a constatat că aceste rezultate concordă cu prevederile teoriei biostructurii, după care inhibitorii metabolici provoacă o destrămare parțială a biostructurii și eliberarea unei părți din apa cuprinsă în ea. S-au calculat atît modificările concentrației ionilor de sodiu în apa liberă a axoplasmei în decursul efluxului menționat, cît și cantitățile apei care se eliberează din biostructura axonului sub influența dinitrofenolului. Apa eliberată din biostructură se adaugă la apa liberă a axoplasmei și modifică concentrația substanțelor dizolvate în aceasta din urmă. Asemenea modificări de concentrație pot juca un rol important în desfășurarea numeroaselor procese biochimice în cercetarea cărora se folosesc inhibitorii metabolici, cum sînt glicoliza, fosforilarea oxidativă și altele.

Compararea concluziilor care se desprind din interpretarea prin prisma teoriilor membranei și biostructurii a rezultatelor cercetărilor experimentale privitoare la materia vie a format pînă acum obiectul a două lucrări. În prima [1] am analizat rezultatele cercetărilor efectuate în 1928 de K. Mond și R. Amson [2] cu privire la repartiția ionilor de potasiu și clor între mușchii trenului posterior de broască și lichide de perfuzie de compoziție diferită, iar în cealaltă [3] ne-am preocupat de rezultatele obținute în 1955 de A.L. Hodgkin și R.D. Keynes [4] prin cercetarea efluxului ionilor de sodiu din axonii giganți de *Sepia* încărcați cu sodiu radioactiv. Scopul ambelor lucrări a fost de a arăta că teoria biostructurii permite nu numai o nouă interpretare, dar și o mai bună valorificare a rezultatelor diferitelor cercetări experimentale aduse în sprijinul altor concepții, ceea ce demonstrează justețea ei.

În continuare, vom examina din același punct de vedere acțiunea inhibitorilor metabolici asupra schimburilor de ioni de sodiu între axonii giganți de *Sepia* și apa de mare, pe baza rezultatelor experimentale obținute de A.L. Hodgkin și R.D. Keynes în 1955 [4]. Pentru a ușura însă compararea concluziilor la care ei au ajuns interpretîndu-și rezultatele

experimentale prin prisma teoriei membranei, cu concluziile la care ajungem noi, interpretîndu-le prin prisma teoriei biostructurii, vom prezenta întîi unele aspecte ale celor două teorii.

1. UNELE ASPECTE ALE TEORIEI MEMBRANEI ŞI ALE TEORIEI BIOSTRUCTURII

Teoria membranei

Teoria membranei postulează că protoplasma este o soluţie apoasă care conţine electroliţi ([5], p. 373, postulatele 1.1, 1.2 şi 1.3). De aceea, conform acestei teorii, „concentraţia ionilor de sodiu în celula vie" se defineşte prin raportul dintre cantitatea ionilor de sodiu şi cantitatea totală de apă din protoplasmă [3].

Bazîndu-se pe definiţia de mai sus şi pe datele analitice obţinute prin dozarea sodiului şi a apei totale în protoplasma axonilor de *Sepia* ([4], p. 35), A.L. Hodgkin şi R.D. Keynes au dedus că în aceşti axoni concentraţia ionilor de sodiu ar fi de numai 40 mM/l, pe cînd în apa de mare ea este de 486 mM/l. Concluzia este că între apa de mare şi axonul de *Sepia* introdus în ea „preexistă" ([4], p. 28) un gradient al concentraţiei ionilor de sodiu.

Dat fiind că membranele celulelor vii sînt permeabile pentru ionii de sodiu, gradientul acesta de concentraţie determină un influx al ionilor de sodiu din apa de mare în axon. Datorită acestui influx, proporţia ionilor de sodiu din axon ar trebui să crească progresiv pînă la stabilirea echilibrului de difuzie. Or, s-a demonstrat că în axonul viu plasat în apa de mare cantitatea ionilor de sodiu nu se modifică. Pentru explicarea acestui fapt, A.L. Hodgkin şi R.S. Keynes au admis că membranele celulelor vii permit nu numai influxul ionilor de sodiu (influxul pasiv de gradient), ci şi transportul forţat al acestor ioni din axon în apa de mare, împotriva gradientului de concentraţie (eflux activ de sodiu). Mecanismul ipotetic care asigură acest transport activ eliminînd fără încetare din axon cantitatea de ioni de sodiu corespunzătoare celei ce pătrunde continuu în el prin influxul pasiv menţinînd astfel concentraţia constantă şi scăzută a ionilor de sodiu în axonii vii, a fost numit pompa de sodiu.

Un eflux activ implică neapărat un consum corespunzător de energie provenită din metabolism. Înseamnă că inhibitorii metabolici, ca dinitrofenolul, azida de sodiu şi alţii, pot frîna pompa şi, prin urmare, pot influenţa schimbul de ioni de sodiu dintre axonul viu şi apa de mare, în care acesta este cufundat.

Teoria biostructurii

Teoria biostructurii postulează că materia din care este alcătuită protoplasma vie se prezintă sub două aspecte profund deosebite : o parte din această materie este integrată într-o structură cu totul specială, caracteristică viului, numită „biostructură", şi reprezintă „materia vie" a protoplasmei, pe cînd cealaltă parte, care nu este integrată în biostruc-

tură, reprezintă „materia nevie" a protoplasmei. Se mai postulează că numai o parte din apa protoplasmei este liberă (apa liberă, apa „materiei nevii"), pe cînd cealaltă parte este integrată în biostructură (apa asimilată, apa „materiei vii") şi se deosebeşte prin însuşirile sale de apa liberă obişnuită ([5], p. 376, postulatele 3.1 şi 3.2).

După teoria biostructurii, între ionii de sodiu aflaţi în axonul viu şi cei din apa de mare, în care axonul este cufundat, există un echilibru de difuzie. Dacă totuşi proporţia ionilor de sodiu în axonul viu este mai mică decît în apa de mare, aceasta se explică admiţînd că în axon ionii de sodiu sînt dizolvaţi numai în apa liberă a protoplasmei în concentraţie egală cu aceea din apa de mare. Prin urmare, teoria biostructurii defineşte „concentraţia ionilor de sodiu în celulele vii" prin raportul dintre cantitatea acestor ioni şi cantitatea de apă liberă din protoplasmă.

Cum biostructura, a cărei apă nu are însuşirea de a dizolva ionii de sodiu, coexistă cu materia nevie, în a cărei apă sînt dizolvaţi aceşti ioni, forţele osmotice tind să elibereze apa cuprinsă în biostructură. Apa eliberată ar dilua soluţia ionilor de sodiu din axon, ceea ce ar determina pătrunderea în axon a unor noi cantităţi de ioni de sodiu din apa de mare.

Or, în axonul viu, introdus în apa de mare, cantitatea de ioni de sodiu nu se modifică. Înseamnă că biostructura reţine apa prin forţe care se opun forţelor osmotice, ceea ce necesită un consum de energie provenită din metabolism. Prin urmare, inhibitorii metabolici pot provoca eliberarea apei integrate în biostructură şi, prin aceasta, pot modifica concentraţia ionilor de sodiu din apa liberă a axoplasmei, influenţînd pe această cale schimbul ionilor de sodiu dintre axonul viu şi apa de mare, în care axonul este introdus.

2. ACŢIUNEA INHIBITORILOR METABOLICI ASUPRA EFLUXULUI IONILOR DE SODIU DIN AXONI

Pentru cercetarea acţiunii inhibitorilor metabolici asupra efluxului de sodiu, A.L. Hodgkin şi R.D. Keynes [4] introduceau întîi axonul proaspăt izolat în apa de mare artificială, care conţinea sodiu radioactiv (Na^{24}), şi-l stimulau electric. Astfel, o cantitate relativ mare de sodiu radioactiv pătrundea în axon. Axonul se introducea apoi în tubul capilar al unui aparat special [6], prin care se trecea un curent de apă de mare normală. Prin măsurarea radioactivităţii probelor de apă culese din timp în timp, se putea urmări efluxul ionilor de sodiu radioactiv din axon. La un moment dat, în locul apei de mare se lăsa să treacă prin aparat soluţia unui inhibitor metabolic, ca dinitrofenolul, cianura de sodiu sau azida de sodiu. Se constata că, în funcţie de concentraţia inhibitorului, efluxul menţionat scădea, dar revenea normal dacă soluţia inhibitorului se înlocuia cu apă de mare normală.

Teoriile membranei şi biostructurii dau acestor rezultate experimentale interpretări diferite.

Teoria membranei

Teoria membranei susține că stimularea electrică a axonului viu de *Sepia*, introdus în apă de mare cu sodiu radioactiv, mărește permeabilitatea membranelor sale și astfel permite o mai rapidă penetrație a ionilor de sodiu în axon. Acest influx, depășind ca intensitate efluxul activ datorit pompei de sodiu, face să se acumuleze în axon o cantitate tot mai mare de ioni de sodiu, inclusiv de sodiu radioactiv. Cu toate acestea, concentrația ionilor de sodiu în axonul stimulat (exprimată prin raportul dintre cantitatea de sodiu și cantitatea apei totale din axoplasmă) rămîne inferioară celei din apa de mare. De exemplu, în cazul unei experiențe, concentrația inițială a ionilor de sodiu în axon a fost de 40mM/l, iar imediat după stimulare de 82 Mm/l. Rezultă că efluxul ionilor de sodiu din axonul încărcat cu sodiu radioactiv se face împotriva gradientului de concentrație, ceea ce se consideră că demonstrează existența „pompei de sodiu".

Prin punerea axonului în contact cu soluția unui inhibitor metabolic, aceasta pătrunde în axon, frînează anumite procese metabolice și micșorează producția de energie necesară activității acestei pompe. Astfel se ajunge la „inhibarea pompei de sodiu" ([4], p. 47) și, în consecință, la scăderea efluxului ionilor de sodiu din axon.

Inhibitorii metabolici pot fi extrași din axonul intoxicat prin spălarea acestuia cu apă de mare normală; aceasta duce la normalizarea progresivă a metabolismului celular, la reactivarea pompei și la revenirea efluxului de sodiu la normal.

Teoria biostructurii

Conform acestei teorii, stimularea electrică a axonului viu introdus în apa de mare ce conține sodiu radioactiv produce destrămarea parțială a biostructurii axoplasmei și eliberarea unei părți din apa acesteia. Astfel, concentrația ionilor de sodiu în apa liberă a axoplasmei scade sub valoarea sa inițială (care a fost egală cu aceea din apa de mare), iar gradientul de concentrație astfel apărut face ca ionii de sodiu, inclusiv cei de sodiu radioactiv, să pătrundă din apa de mare în axon, fenomen care poate fi ușurat și de creșterea permeabilității membranelor axonului sub acțiunea stimulării electrice. După încetarea stimulării, biostructura se refăce și reintegrează în ea apa pe care o eliberase. Astfel, cantitatea de apă liberă din axon revine la normal și, cum sodiul se găsește aici în cantitate mai mare decît înainte de stimulare, concentrația lui crește peste valoarea inițială, depășind pe aceea din apa de mare (concentrațiile se definesc conform teoriei biostructurii). Apare astfel un nou gradient de concentrație, care determină efluxul sodiului din axon. De altfel, în lucrarea precedentă [3] noi am arătat că efluxul acesta este un eflux de difuzie, deoarece concentrația ionilor de sodiu în axon scade în funcție de timp, conform legii difuziei a lui Fick.

Punînd axonul în contact cu soluția unui inhibitor metabolic, acesta pătrunde în axon, frînează anumite procese metabolice și micșorează astfel producerea energiei necesare menținerii integrității biostruc-

turii, ceea ce duce la eliberarea parţială a apei, precum şi a altor substanţe din biostructura axoplasmei. Apa eliberată se adaugă la apa liberă din axon, în care sînt dizolvaţi ionii de sodiu, concentraţia acestora scade, gradientul de concentraţie faţă de apa de mare se micşorează, iar toate acestea duc la încetinirea şi chiar oprirea efluxului ionilor de sodiu din axon.

Extrăgînd apoi inhibitorii din axon, prin săplarea acestuia cu apă de mare, metabolismul celular se normalizează, aportul de energie metabolică se restabileşte şi biostructura se reface, reintegrînd apa care fusese eliberată. Aceasta duce la creşterea corespunzătoare a concentraţiei ionilor de sodiu în apa liberă din axon, la accentuarea progresivă a gradientului de concentraţie a ionilor de sodiu între axon şi apa de mare şi, în consecinţă, la intensificarea efluxului ionilor de sodiu.

Pentru verificarea justeţei acestei interpretări, era indicat :

a) să arătăm că teoria biostructurii ne permite să calculăm cantitatea de apă ce se eliberează din biostructura axonului de *Sepia* sub acţiunea inhibitorilor metabolici ;

b) să demonstrăm, prin cercetări directe, că inhibitorii metabolici introduşi în indiferent ce material biologic viu provoacă eliberarea unei părţi din apa integrată în biostructura acestuia.

a. *Calculul estimativ al cantităţii de apă ce se eliberează din biostructura axonului de Sepia sub acţiunea dinitrofenolului*

Efluxul ionilor de sodiu radioactiv din axonul de *Sepia*, încărcat cu aceşti ioni şi introdus în apă de mare normală, a fost măsurat de A.L Hodgkin şi R.D. Keynes, iar rezultatele obţinute ([4], p. 36, tabela 3) sînt prezentate în tabela 1 (col. 4). Se constată că după introducerea dinitrofenolului efluxul scade, dar revine la normal după îndepărtarea inhibitorului prin spălarea axonului cu apă de mare.

După cum am arătat în lucrarea precedentă [3], pînă la introducerea dinitrofenolului (primele şase măsurători) efluxul se produce conform ecuaţiei (1), dedusă din legea difuziei a lui

$$x = (A - c_0) - 10^{*\log(A-c_0)-Kt} \qquad (1)$$

Fick, în care : $A = 371$ nM/373 nl, $c_0 = 181$ nM/373 nl, $K = 0{,}00461$, iar x este cantitatea de sodiu exprimată în nM, care părăseşte axonul prin eflux de gradient în decursul timpului t, exprimat în minute.

De aici înainte (măsurătorile 7—10) admitem că efluxul scade datorită apei eliberate din biostructura axoplasmei sub acţiunea dinitrofenolului pătruns în axon şi apoi, după eliminarea inhibitorului din axon, creşte (măsurătorile 11—13) datorită reintegrării în biostructură a apei care a fost eliberată. Pentru estimarea cantităţii acestei ape facem următorul raţionament.

Presupunînd că efluxul ionilor de sodiu din axon s-ar face în condiţii normale, adică în absenţa dinitrofenolului, ecuaţia (1) ne permite să calculăm concentraţia sodiului total din axon în orice moment al experienţei. Pentru aceasta, von scădea din $A = 371$ nM/373 nl valoarea x,

calculată cu ajutorul ecuației (1) pentru momentul t corespunzător (tabela 1, col. 3 și 9). Diferența dintre valorile concentrațiilor astfel calculate pentru două momente t diferite ne dă efluxul mediu E al sodiului total în perioada delimitată de aceste momente (în tabela 1, col. 10, acest eflux mediu este calculat pentru perioade de cîte 20 min), iar media lor (tabela 1, col. 11) reprezintă concentrația medie a sodiului total [Na] în axon în aceeași perioadă.

Pe de altă parte, cunoscînd concentrația $[Na^*]_t$ a sodiului radioactiv în apa liberă a axoplasmei la un moment dat t (la începutul experienței, această concentrație, calculată pe baza valorii de 72 nM/l, măsurată de A.L. Hodgkin și R.D. Keynes ([4], p. 36, tabela 3, col. 2), a fost de 326 nM/373 nl, col. 8 a tabelei 1), putem calcula cu ajutorul ecuației (2):

$$[Na^*]_{t+1} = [Na^*]_t \frac{[Na]_{t+1} - I_t}{[Na]_t}, \qquad (2)$$

concentrația $[Na^*]_{t+1}$ pe care el o mai are în această apă liberă la un alt moment t. În această formulă, $[Na]_t$ și $[Na]_{t+1}$ reprezintă concentrațiile sodiului total în apa liberă a axoplasmei la începutul și la sfîrșitul perioadei respective (pentru perioade succesive de cîte 20 min, aceste valori sînt înscrise în tabela 1, col. 9), iar I_t reprezintă influxul de sodiu din apa de mare în axon, calculat pentru începutul fiecărei perioade conform indicațiilor din lucrarea precedentă [3]; valorile corespunzătoare perioadelor succesive de cîte 20 min din tabela 1 sînt înscrise în col. 14.

Diferențele dintre concentrațiile succesive ale sodiului radioactiv [Na*], calculate după formula (2) (tabela 1, col. 8), reprezintă efluxul mediu E^* al sodiului radioactiv în perioadele corespunzătoare de timp (tabela 1, col. 7).

Menționăm că formula (2) se deduce din relațiile dintre efluxul de gradient E_g^* al sodiului radioactiv, efluxul de compensare E_c^* al sodiului radioactiv, efluxul total E^* al sodiului radioactiv și concentrațiile inițiale și finale ale sodiului total $[Na]_t$ și $[Na]_{t+1}$, stabilite în lucrarea precedentă ([3], formulele IV, VIII, IX și XI), și anume pe baza relației (3):

$$E_g = \frac{E^*_g}{r_t}, \qquad (3)\ ([3], \text{form. XI})$$

în care

$$r_t = \frac{[Na^*]_t}{[Na]_t}, \qquad (4)\ ([3], \text{form. IV})$$

$$E_g = [Na]_t - [Na]_{t+1}, \qquad (5)$$

$$E_g^* = E^* - E_c^*, \qquad (6)\ ([13], \text{form. IX})$$

$$E^* = [Na^*]_t - [Na^*]_{t+1} \qquad (7)$$

și

$$E_c^* = r_t\ I_t. \qquad (8)\ ([3], \text{form. VIII})$$

Tabela 1

Efluxurile de sodiu din axonul de *Sepia* încărcat cu sodiu radioactiv și supus apoi acțiunii dinitrofenolului între minutele 100—200 ale experienței

Efluxul sodiului radioactiv măsurat de A. L. Hodgkin și R D. Keynes (col. 4) și exprimat în nM/20 min (col. 5). Efluxul mediu al sodiului radioactiv pentru fiecare perioadă de 20 min, dedus din datele din coloana 5 (col. 6). Concentrația sodiului radioactiv care ar fi fost în apa liberă a axoplasmei în condițiile normale, adică fără adaos de dinitrofenol, calculată după formula (II) (col. 8). Efluxul mediu al sodiului radioactiv pentru fiecare perioadă de 20 min, calculat din datele din coloana 8 (col. 7). Concentrația sodiului total în apa liberă a axoplasmei, calculată după ecuația de difuzie (I) pentru condiții normale (col. 9). Efluxul mediu al sodiului total pentru fiecare perioadă de 20 min, calculat din datele din coloana 9 (col. 10), și concentrațiile medii ale sodiului total corespunzătoare efluxurilor medii din coloana 10 (col. 11), calculate pentru condiții normale. Concentrațiile medii ale sodiului total în cazul experienței cu dinitrofenol, calculate cu ajutorul datelor cuprinse în coloanele 6, 7, 10 și 11 (col. 12).

E * — efluxul ionilor de sodiu radioactiv; *E* — efluxul sodiului total; [Na*] — concentrația sodiului radioactiv în apa liberă a axoplasmei; [Na] — concentrația sodiului total în apa liberă a axoplasmei; DNP — dinitrofenol; *t* — timp în minute; *I* — influxul ionilor de sodiu.

Nr. crt.	DNP	t min	*E* * pM/cm² s măsurat	*E* * nM/20 min măsurat	*E* * mediu nM/20 min dedus	*E* * mediu nM/20 min calculat	[Na *] nM/373 nl calculată	[Na] nM/373 nl calculată	*E* nM/20 min	[Na] medie nM/373 nl calculată pt. condiții normale	[Na] medie nM/373 nl calculată pt. exper. cu dinitrofenol	*I* pM/cm² s	*I* nM/20 min
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1		0	(43)	51,6			326,0	371,0				15,30	18,46
2		20	37	44,4	48,0	48,0	278,0	334,7	36,3	352,8	352,8	17,00	20,40
3		40	32	38,4	41,4	41,4	236,6	305,3	29,4	320,0	320,0	18,70	22,44
4		60	28	33,6	36,0	35,8	200,7	281,5	23,8	293,4	293,4	20,40	24,48
5		80	24	28,8	31,2	31,1	169,6	262,3	19,2	271,9	271,9	22,10	26,52
6		100	21	25,2	27,0	27,2	142,4	246,7	15,6	254,5	254,5	23,80	28,56
7	DNP	120	14,4	17,28	21,24	23,7	118,7	234,2	12,5	240,4	233,9	25,50	30,60
8	,,	140	3,2	3,84	10,5	20,7	98,02	224,0	10,2	229,1	205,4	27,20	32,64
9	,,	160	1,1	1,32	2,58	17,87	80,15	215,8	8,2	219,5	186,4	28,90	34,68
10	0,2 mM	180	0,74	0,89	1,105	15,37	64,78	209,1	6,7	212,4	183,3	30,60	36,72
11		200	2,9	3,48	2,185	13,05	51,73	203,7	5,4	206,4	185,6	31,30	38,76
12		220	9,0	10,80	7,14	10,94	40,79	199,4	4,3	201,6	194,0	32,00	40,80
13		240	9,2	11,04	10,92	9,06	31,73	195,9	3,5	197,6	201,0	33,70	42,84
14		260	8,15	9,78	10,41	7,41	24,32	193,0	2,9	194,4	201,0	35,40	44,88
15		280	7,2	8,64	9,21	5,95	18,37	190,7	2,3	191,8	197,9	36,10	46,92
16		300	—	—				188,9	1,8	189,8			
17		320	—	—				187,4	1,5	188,2			
18		340	—	—				186,1	1,3	186,8			
19		360	—	—				185,2	0,9	185,6			
20		380	—	—				184,4	0,8	184,8			
21		400	—	—				183,7	0,7	184,0			
22		420	—	—					0,5	183,4			
23		440							0,4	183,0			

Tabela 1.

Efluxurile de sodiu din axonul de Sepia încărcat cu sodiu radioactiv și supus apoi acțiunii dinitrofenolului între minutele 100–200 ale experienței

Efluxul sodiului radioactiv măsurat de A. L. Hodgkin și R. D. Keynes (col. 4) și exprimat în nM/20 min (col. 5). Efluxul mediu al sodiului radioactiv pentru fiecare perioadă de 20 min, dedus din datele din coloana 5 (col. 6). Concentrația sodiului radioactiv care ar fi fost în apa liberă a axoplasmei în condițiile normale, adică fără adaos de dinitrofenol, calculată după formula (II) (col. 8). Efluxul mediu al sodiului radioactiv pentru fiecare perioadă de 20 min, calculat din datele din coloana 8 (col. 7). Concentrația sodiului total în apa liberă a axoplasmei, calculată după ecuația de difuzie (I) pentru condiții normale (col. 9). Efluxul mediu al sodiului total pentru fiecare perioadă de 20 min, calculat din datele din coloana 9 (col. 10), și concentrațiile medii ale sodiului total corespunzătoare efluxurilor medii din coloana 10 (col. 11), calculate pentru condiții normale. Concentrațiile medii ale sodiului total în cazul experienței cu dinitrofenol, calculate cu ajutorul datelor cuprinse în coloanele 6, 7, 10 și 11 (col. 12).

E * – efluxul ionilor de sodiu radioactiv; E – efluxul sodiului total; [Na*] – concentrația sodiului radioactiv în apa liberă a axoplasmei; [Na] – concentrația sodiului total în apa liberă a axoplasmei; DNP – dinitrofenol; t – timp în minute; I – influxul ionilor de sodiu.

Nr. crt.	DNP	t min	E * pM/cm²s măsurat	E * nM/20 min măsurat	E * mediu nM/20 min dedus	E * mediu nM/20 min calculat	[Na *] nM/373 ml calculată	[Na] nM/373 ml calculată	E nM/20 min	[Na] medie nM/373 ml calculată pt. condiții normale	[Na] medie nM/373 ml calculată pt. exper. cu dinitrofenol	I pM/cm²s	I nM/20 min
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1		0	(43)	51,6			326,0	371,0				15,30	18,46
2		20	37	44,4	48,0	48,0	278,0	334,7	36,3	352,8	352,8	17,00	20,40
3		40	32	38,4	41,4	41,4	236,6	305,3	29,4	320,0	320,0	18,70	22,44
4		60	28	33,6	36,0	35,8	200,7	281,5	23,8	293,4	293,4	20,40	24,48
5		80	24	28,8	31,2	31,1	169,6	262,3	19,2	271,9	271,9	22,10	26,52
6		100	21	25,2	27,0	27,2	142,4	246,7	15,6	254,5	254,5	23,80	28,56
7	DNP	120	14,4	17,28	21,24	23,7	118,7	234,2	12,5	240,4	233,9	25,50	30,60
8	„	140	3,2	3,84	10,5	20,7	98,02	224,0	10,2	229,1	205,4	27,20	32,64
9	„	160	1,1	1,32	2,58	17,87	80,15	215,8	8,2	219,5	186,4	28,90	34,68
10	0,2 mM	180	0,74	0,89	1,105	15,37	64,78	209,1	6,7	212,4	183,3	30,60	36,72
11		200	2,9	3,48	2,185	13,05	51,73	203,7	5,4	206,4	185,6	31,30	38,76
12		220	9,0	10,80	7,14	10,94	40,79	199,4	4,3	201,6	194,0	32,00	40,80
13		240	9,2	11,04	10,92	9,06	31,73	195,9	3,5	197,6	201,0	33,70	42,84
14		260	8,15	9,78	10,41	7,41	24,32	193,0	2,9	194,4	201,0	35,40	44,88
15		280	7,2	8,64	9,21	5,95	18,37	190,7	2,3	191,8	197,9	36,10	46,02
16		300	–	–				188,9	1,8	189,8			
17		320	–	–				187,4	1,5	188,2			
18		340	–	–				186,1	1,3	186,8			
19		360	–	–				185,2	0,9	185,6			
20		380	–	–				184,4	0,8	184,8			
21		400	–	–				183,7	0,7	184,0			
22		420	–	–					0,5	183,4			
23		440							0,4	183,0			

Urmărind în tabela 1 valorile medii succesive ale efluxului total E^* de sodiu radioactiv, calculate pe perioade de cîte 20 min în modul de mai sus (col. 7), şi comparîndu-le cu valorile corespunzătoare din col. 6, deduse din datele experimentale ale lui A.L. Hodgkin şi R.D. Keynes (col. 5), se poate constata o foarte bună concordanţă între cele două serii de valori pînă la perioada cuprinsă între 80 şi 280 min.

O dată cu adăugarea dinitrofenolului, care a avut loc în perioada cuprinsă între 100 şi 120 min de la începutul experienţei, situaţia se schimbă : pe toată durata tratamentului cu această substanţă, pînă în minutul 180, efluxul mediu E^* al sodiului radioactiv, dedus din determinările experimentale (col. 6), rămîne sub valorile calculate pe baza teoriei biostructurii pentru un eflux mediu neinfluenţat de acest inhibitor metabolic (col. 7). Se poate constata totodată că în tot acest interval (100—180 min) efluxul mediu E^* de sodiu radioactiv din perioadele succesive de cîte 20 min scade puternic în prezenţa dinitrofenolului ; de exemplu, pentru perioada 100—120 min, raportul dintre valoarea acestui eflux, înscrisă în col. 6, şi cea corespunzătoare din col. 7, este egal cu 21,24 : 23,7 = 0,8962, iar în perioada imediat următoare acest raport scade la 10,5 : 20,7 = 0,5072. Aşadar, pe cînd în perioada 100—120 min influenţa dinitrofenolului se manifestă prin micşorarea efluxului mediu de sodiu radioactiv la circa nouă zecimi din valoarea normală, în perioada următoare, 120—140 min, această influenţă este considerabil intensificată, efluxul scăzînd pînă la circa jumătate din valoarea lui normală şi aşa mai departe.

Conform teoriei biostructurii, aceste modificări ale efluxului de ioni de sodiu radioactiv după adăugarea unui inhibitor metabolic sînt interpretate ca fiind consecinţa unei diluări a soluţiei acestor ioni în apa liberă din axoplasmă. Cum însă diluarea soluţiei intraplasmatice nu modifică raporturile dintre concentraţiile diferitelor categorii de ioni de sodiu pe care aceasta îi conţine, urmează că sub acţiunea dinitrofenolului efluxul de sodiu neradioactiv trebuie să scadă şi el în aceeaşi proporţie ca şi cel de sodiu radioactiv. Pentru a ne da seama de modificările ce survin în intensitatea acestor efluxuri, de exemplu în perioada cuprinsă între minutele 100 şi 120, este necesar să stabilim mai întîi, conform normelor indicate în lucrarea noastră precedentă [3], bilanţul fluxurilor în cadrul schimburilor normale de sodiu dintre axon şi apa de mare (tabela 2, partea A), iar apoi să reducem toate efluxurile de sodiu în proporţia respectivă, înmulţind valorile lor numerice cu coeficientul 0,8962 (tabela 2, partea B).

Din compararea datelor astfel obţinute se poate constata, de exemplu, că sub acţiunea dinitrofenolului efluxul de gradient al sodiului total scade în perioada 100—120 min de la 12,50 nM/20 min, cît ar fi fost normal, la 11,17 nM/20 min. Or, conform datelor cuprinse în coloanele 10 şi 11 ale tabelei 1, unui eflux de gradient al sodiului total de 12,50 nM/20 min îi corespunde în apa liberă a axoplasmei o concentraţie de 240,4 nM/373 nl, iar unui eflux de 11,17 nM/20 min i-ar corespunde (prin interpolare) o concentraţie de 233,9 nM/373 nl (tabela 1, col. 12). Astfel se pot calcula concentraţiile ionilor de sodiu din axon pentru toate perioadele de cîte 20 min ale experienţei, în decursul cărora axonul a fost sub acţiunea dinitrofenolului (tabela 1, col. 12). După cum se constată, dinitrofenolul produce o scădere apreciabilă a concentraţiei sodiului în apa

liberă a axoplasmei. După îndepărtarea dinitrofenolului, biostructura se reface, apa care a fost eliberată sub influența lui se reintegrează în această structură și astfel concentrația ionilor de sodiu crește. Se înțelege că, datorită unei anumite acumulări a ionilor de sodiu în axoplasmă, produsă în timpul cînd scăderea concentrației provocată de dinitrofenol favoriza influxul acestor ioni în axon, după restabilirea biostructurii, concentrația ionilor de sodiu depășește pe aceea care ar fi fost în axon,

Tabela 2

Bilanțul efluxurilor ionilor de sodiu între minutele 100 și 120 ale experienței efectuate de A. L. Hodgkin și R. D. Keynes ([4], p. 36, tab. 3) pe axonul de *Sepia* încărcat cu sodiu radioactiv și plasat în apa de mare normală, în absența (*A*) și în prezența dinitrofenolului (*B*). Efluxurile de gradient ale sodiului total sînt subliniate prin cifre mai groase

– influx: E_c^0 – eflux neradioactiv de compensare: E_c – eflux total de compensare: E_c^* – eflux radioactiv de compensare: E_g^* – eflux radioactiv de gradient: E_g – eflux total de gradient: E_g^0 – eflux neradioactiv de gradient: T – total. [Na] – concentrația sodiului total în apa liberă a axoplasmei: [Na°] – concentrația sodiului neradioactiv în apa liberă a axoplasmei. [Na*] – concentrația sodiului radioactiv în apa liberă a axoplasmei. Efluxurile din partea *A* sînt notate cu E_A, iar cele din partea *B* cu E_B.

$r = \frac{[Na^*]}{[Na]}$ $\qquad E_B = 0{,}8962\ E_A$

Partea *A* Efluxurile în absența dinitrofenolului					Partea *B* Efluxurile în prezența dinitrofenolului				
Influxul : 23,8 pM/cm² s, respectiv 28,56 nM/20 min Efluxul radioactiv total Media : 23,70 nM/20 min					Influxul : 23,8 pM/cm²s, respectiv 28,56 nM/20 min Efluxul radioactiv total Inițial 21,0 pM/cm² s, respectiv 25,20 nM/20 min Final 14,4 pM/cm²s, respectiv 17,28 nM/20 min Media : 17,7 pM/cm² s, respectiv, 21,24 nM/20 min				
$r = 0{,}5772$					$r = 0{,}5772$				
t min	[Na] nM/373 nl	[Na°] nM/373 nl	[Na*] nM/373 nl	Fluxurile	t min	[Na] nM/373 nl	[Na°] nM/373 nl	[Na*] nM/373 nl	Fluxurile
100	246,7	104,3	142,4		100	246,7	104,3	142,4	
	+28,56	+28,56	0	I		+28,56	+28,56	0	I
		−12,08		E_c^0			−10,83		E_c^0
	−28,56			E_c		−25,60			E_c
			−16,48	E_c^*				−14,77	E_c^*
			−7,22	E_g^*				− 6,47	E_g^*
	−12,50			E_g		*−11,20*			E_g
	− 5,26			E_g^0			− 4,71		E_g^0
	−12,5	+11,2	−23,7	T		− 8,2	+13, 0	−21, 2	T
120	234,2	115,5	118,7		120	238,5	117,3	121,2	

dacă acesta n-ar fi fost tratat cu dinitrofenol. Aceasta se oglindeşte din datele cuprinse în tabela 1, coloanele 11—12, începînd de la minutul 240 în sus. Creşterea relativă a concentraţiei sodiului total în apa liberă a axoplasmei se traduce, de altfel, şi prin creşterea corespunzătoare a efluxului sodiului radioactiv din axon (tabela 1, col. 6 în comparaţie cu col. 7).

În fine, datele cuprinse în coloanele 11 şi 12 ale tabelei 1 permit calculul cantităţii de apă care se eliberează sub acţiunea dinitrofenolului şi micşorează concentraţia sodiului în apa liberă a axoplasmei. Într-adevăr, dacă în perioada dintre minutele 100 şi 120 ale unei experienţe efectuate în condiţii normale, adică în absenţa dinitrofenolului, concentraţia medie a sodiului în axon ar fi fost de 240,4 nM/373 nl, iar din cauza dinitrofenolului ea a devenit 233,9 nM/373 nl (tabela 1, col. 11 şi 12), înseamnă că, datorită acestui inhibitor metabolic în axonul intoxicat, cei 240,4 nM sodiu se găsesc într-o cantitate de apă care depăşeşte 373 nl. Prin regula de trei simple se află că surplusul apei este de 10,4 nl. În acelaşi mod se pot calcula în continuare cantităţile de apă care se eliberează şi în celelalte perioade ale acestei experienţe, precum şi cantităţile de apă care se reintegrează în biostructura axoplasmei după îndepărtarea din axon a inhibitorului metabolic. Rezultatele acestor calcule sînt prezentate în tabela 3, col. 4, 5 şi 6. Exprimate în ml şi raportate la 1000 ml ai apei din axoplasmă (tabela 3, col. 7, 8 şi 9), datele respective arată

Tabela 3

Cantitatea apei ce se eliberează din biostructura axoplasmei axonilor giganţi de *Sepia* sub acţiunea dinitrofenolului. Normal: apa asimilată 4159 nl, respectiv 917,7 ml, şi apa liberă 373 nl, respectiv 82,3 ml, sînt raportate la apa totală: 4532 nl, respectiv 1000 ml.

Nr. crt.	DNP	Perioada min	Apa liberă din axoplasmă nl/4532 nl	Apa eliberată din biostructură nl	Apa reintegrată în biostructură nl	Apa liberă din axoplasmă ml/l	Apa eliberată din biostructură ml	Apa reintegrată în biostructură ml
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1		0—20	373	—	—	82,3	—	—
2		20—40	373	—	—	82,3	—	—
3		40—60	373	—	—	82,3	—	—
4		60—80	373	—	—	82,3	—	—
5		80—100	373	—	—	82,3	—	—
6	+	100—120	383,4	10,4	—	84,6	2,3	—
7	+	120—140	416,0	43,0	—	91,8	9,5	—
8	+	140—160	440,0	67,0	—	97,1	16,8	—
9	+	160—180	432,0	59,0	8,0	95,3	14,8	2,0
10		180—200	414,0	41,0	26,0	91,3	9,0	7,8
11		200—220	387,6	14,6	52,4	85,5	3,2	13,6
12		220—240	373	—	67,0	82,3	—	16,8

că dinitrofenolul provoacă eliberarea unei cantităţi relativ mici de apă din biostructură (cel mult 17 ml din 917,7 ml, adică mai puţin de 2%) şi totuşi această cantitate este suficientă pentru a perturba toate efluxurile de sodiu din axon. Dar, după cum am menţionat chiar în titlul acestui subcapitol al lucrării, acest calcul al cantităţii de apă ce se eliberează din biostructura axoplasmei sub influenţa dinitrofenolului trebuie con-

siderat ca valabil numai în primă aproximaţie, deoarece nu s-a ţinut seama de eventualele schimburi de apă dintre axon şi apa de mare şi nici de eliberarea din această biostructură a altor substanţe care ar putea influenţa şi ele repartiţia apei între axon şi mediul extern. Rolul acestor factori va fi luat în considerare în alte lucrări.

Se poate trage totuşi de pe acum concluzia că teoria biostructurii permite o nouă interpretare a rezultatelor experimentale obţinute de A.L. Hodgkin şi R.D. Keynes în cercetările lor privitoare la acţiunea inhibitorilor metabolici asupra efluxului ionilor de sodiu din axonii de *Sepia* încărcaţi cu sodiu radioactiv. Această nouă interpretare se deosebeşte profund de cea dată aceloraşi rezultate experimentale în lumina teoriei membranei.

b. *Eliberarea apei integrate în biostructura ţesuturilor vii sub acţiunea inhibitorilor metabolici*

Pentru verificarea ipotezei după care inhibitorii metabolici provoacă eliberarea unei părţi din apa integrată în biostructură, am iniţiat unele cercetări experimentale pe material biologic viu de natură vegetală. Rezultatele obţinute concordă cu teoria biostructurii şi de aceea pot fi aduse în sprijinul consideraţiilor expuse aici [7].

3. ACŢIUNEA INHIBITORILOR METABOLICI ASUPRA INFLUXULUI IONILOR DE SODIU ÎN AXON

Cercetările efectuate de A.L. Hodgkin şi R.D. Keynes au demonstrat că la axonii vii de *Sepia* (fie încărcaţi cu ioni de sodiu prin stimulare electrică, fie neîncărcaţi), introduşi în apă de mare normală, alături de efluxul ionilor de sodiu, din axon în apa de mare, se mai produce şi un influx al acestor ioni, din apa de mare în axon.

Pentru a pune în evidenţă şi a măsura acest influx, autorii citaţi au adoptat următorul procedeu experimental.

După o stimulare electrică în apă de mare normală, axonul se introducea în aparatul propus de R.D. Keynes [6] şi se trecea peste el un curent de apă de mare artificială, cu sodiu radioactiv. Din cînd în cînd se măsura radioactivitatea axonului şi astfel se stabilea cantitatea de sodiu radioactiv care a pătruns în axon, ceea ce permitea urmărirea influxului respectiv. Unele rezultate ale acestor cercetări sînt prezentate în tabela 4. Se constată că adaosul de dinitrofenol nu influenţează prea mult (scade puţin) intensitatea acestui influx.

Teoria membranei

Expunîndu-şi rezultatele experimentale, A.L. Hodgkin şi R.D. Keynes arată că „...experienţele au durat aproximativ 6 ore şi este probabil că valorile mari din tabela 4, coloana c, se datoresc mai curînd deteriorării axonului decît îndepărtării dinitrofenolului. Dacă această

presupunere este justă, atunci se poate conchide că efectul dinitrofenolului asupra influxului de sodiu este slab ; chiar dacă nu se ia în considerare înrăutăţirea stării axonului, este clar că reducerea influxului provocată de dinitrofenol este neînsemnată în comparaţie cu efectul exercitat de dinitrofenol asupra efluxului de sodiu" ([4], p. 37).

Tabela 4

Efectul dinitrofenolului asupra influxului de sodiu la axonii de *Sepia*

„Concentraţia dinitrofenolului a fost de 0,2 mM cu excepţia experienţei nr. 1 unde a fost de 0,1 mM. Experienţele nr. 1 şi 2 s-au făcut pe axoni stimulaţi puţin, iar celelalte pe axoni stimulaţi în prealabil timp de 5 – 10 min la 50/s. Temperatura 18 – 20°C." „Unele valori mari din coloana c se datoresc mai curînd deteriorării axonului decît îndepărtării dinitrofenolului" ([4] p. 37).

(după A.L. Hodgkin şi R.D. Keynes, 1955 41, p. 39, tab. 5)

Exp nr.	Diametrul axonului (μ)	Influxul de sodiu pM/cm² s			$\sqrt{a.c.}$ media normal
		(*a*) normal	(*b*) DNP	(*c*) normal	
1	2	3	4	5	6
1	205	20,6	17,8	20,1	20,4
2	212	7,7	13,5	11,3	9,3
3	167	15,5	13,2	44,4	26,2
4	184	24,1	17,2	73,0	42,0
5	148	16,6	15,0	21,7	19,0
Media :		17,0	15,0	34,0	23,0

Reamintim că, conform teoriei membranei, concentraţia ionilor de sodiu aflaţi în axonul viu, chiar în cel încărcat cu sodiu prin stimulare electrică, este mai mică decît în apa de mare (40—92 mM/l faţă de 486 mM/l). Dacă lucrurile stau astfel, se înţelege că influxul acestor ioni din apa de mare în axon trebuie considerat ca un influx pasiv, datorat gradientului de concentraţie al acestor ioni între apa de mare şi axon. Ţinînd seama că, după teoria membranei, inhibitorii metabolici influenţează numai fluxurile ionice active, care se produc împotriva gradienţilor de concentraţie şi necesită un consum de energie, urmează că influxul pasiv de mai sus nu va fi influenţat de dinitrofenol.

Teoria biostructurii

Conform acestei teorii, concentraţia ionilor de sodiu în apa liberă a axoplasmei axonului viu normal (486 mM/l) este egală cu aceea din apa de mare (486 mM/l) şi creşte considerabil după stimularea electrică a axonului (de exemplu la 996 mM/l). De aceea, influxul ionilor de sodiu nu poate fi datorat vreunui gradient de concentraţie între apa de mare şi axon (cum susţine teoria membranei), ci depinde de permeabilitatea membranelor axonului viu pentru electroliţi, aceasta permite, într-o anumită măsură, un schimb liber de ioni între axon şi apa de mare. Datorită acestui schimb ionic, liber, influxul menţionat este egalat de un eflux corespunzător de compensare [3], astfel că nu are loc vreo creştere a concentraţiei ionilor de sodiu în axon.

Dat fiind că A.L. Hodgkin şi R.D. Keynes au cercetat influxul ionilor de sodiu în axonii în prealabil stimulaţi electric, înseamnă că, conform teoriei biostructurii, în axonii respectivi concentraţia ionilor de sodiu o depăşea pe aceea din apa de mare. În prezenţa dinitrofenolului, care provoacă eliberarea unei părţi din apa integrată în biostructura axoplasmei, concentraţia mărită a ionilor de sodiu din axonii stimulaţi electric scade sub 190 nM/373 nl, apropiindu-se deci de aceea din apa de mare (181 nM/373 nl) (tabela 1, col. 12). În aceste condiţii, este de prevăzut ca influxul ionilor de sodiu în axoni să fie apropiat ca intensitate de influxul constatat în condiţiile normale, adică în absenţa dinitrofenolului, ceea ce concordă cu datele experimentale obţinute de A.L. Hodgkin şi R.D. Keynes.

4. CONSIDERAŢII FINALE

După cum s-a văzut mai sus, rezultatele obţinute de A.L. Hodgkin şi R.D. Keynes [4] în cercetările lor privitoare la acţiunea inhibitorilor metabolici asupra fluxurilor ionilor de sodiu la axonii giganţi de *Sepia* duc la concluzii diferite, după cum sînt interpretate de pe poziţiile teoriei membranei sau de pe acelea ale teoriei biostructurii. Aceasta se datoreşte mai ales faptului că cele două teorii definesc în mod diferit „concentraţia ionilor de sodiu în celulele vii". După teoria membranei, această concentraţie este definită prin raportul dintre cantitatea de sodiu şi cantitatea apei totale din protoplasmă, pe cînd teoria biostructurii o defineşte prin raportul dintre cantitatea de sodiu şi cantitatea de apă liberă (nu de apă totală), existentă în protoplasmă.

Oricît de diferite ar fi aceste concluzii, ele sînt şi într-un caz, şi în celălalt logice. Nu trebuie să se uite însă că în problema pe care o analizăm aici justeţea acestor concluzii depinde de valabilitatea definiţiei ce se dă „concentraţiei ionilor de sodiu în celulele vii" şi că, la rîndul ei, valabilitatea acestei definiţii depinde de valabilitatea postulatelor teoriei respective. Atîta timp cît aceste postulate se admit apriori, caracterul lor ipotetic se repercutează atît asupra definiţiei care se dă „concentraţiei ionilor de sodiu în celulele vii", cît şi asupra tuturor deducţiilor şi concluziilor care se bazează pe această definiţie. De aceea, contrar convingerii multor cercetători care lucrează în acest domeniu, valorile atribuite de A.L. Hodgkin şi R.D. Keynes, precum şi de alţi autori, concentraţiei ionilor de sodiu în axoplasma axonilor vii sînt ipotetice, iar valabilitatea lor depinde de valabilitatea postulatelor teoriei membranei. De altfel, într-o lucrare anterioară ([5], p. 379, 381, 382 şi 403) am insistat atît asupra naturii ipotetice a concluziilor ce se desprind din interpretarea rezultatelor diferitelor cercetări experimentale prin prisma teoriei membranei, cît şi asupra tendinţei unor autori de a prezenta ca „fapte experimentale" anumite concluzii ipotetice bazate pe postulatele acestei teorii.

Este evident că şi în teoria biostructurii, întocmai ca şi în teoria membranei, valabilitatea concluziilor depinde de valabilitatea definiţiei „concentraţiei ionilor de sodiu în celulele vii", dependentă, la rîndul ei, de valabilitatea postulatelor pe care se bazează

această teorie. Fără îndoială, şi aici admiterea apriori a acestor postulate face ca fondul lor ipotetic să se reflecte atît în definiţia „concentraţiei ionilor de sodiu în celulele vii", cît şi în toate deducţiile şi concluziile care se bazează pe această definiţie. Aceasta însă nu ne împiedică să fim de părere că postulatele teoriei biostructurii sînt mai aproape de realitate decît postulatele teoriei membranei, fie şi numai pe considerentul că, pentru a explica fenomenele discutate în prezenta lucrare, ele permit să ne dispensăm de ipotetica pompă de sodiu.

Pentru a încheia, menţionăm că modificarea cantităţii de apă liberă din celulele vii, provocată de inhibitorii metabolici, precum şi modificarea corespunzătoare a concentraţiei diferitelor substanţe dizolvate în această apă nu au fost luate pînă acum în considerare în cadrul cercetărilor referitoare la biochimismul organismelor vii. Acestor modificări le poate reveni însă un rol important în desfăşurarea numeroaselor procese biochimice cînd în cercetarea lor se folosesc inhibitorii metabolici, cum sînt glicoliza, fosforilarea oxidativă şi altele. De aceea, în lucrările viitoare vom prezenta aplicaţiile teoriei biostructurii în aceste domenii ale biochimiei actuale.

5. CONCLUZII

1. Inhibitorii metabolici, ca dinitrofenolul, cianura de sodiu şi azida de sodiu, determină eliberarea unei părţi din apa integrată în biostructura celulelor vii.

2. După îndepărtarea inhibitorului metabolic, biostructura se reface şi reintegrează în ea apa care a fost eliberată.

3. Eliberarea apei din biostructură şi reintegrarea ei în aceasta din urmă modifică concentraţia ionilor de sodiu din apa liberă a axoplasmei, ceea ce se repercutează asupra efluxului şi influxului acestor ioni din şi în axon.

4. Modificările concentraţiei ionilor de sodiu în axoplasmă, provocate de inhibitorii metabolici, precum şi cantităţile de apă asimilată ce se eliberează din biostructură sub acţiunea acestora pot fi calculate cu ajutorul ecuaţiei deduse din legea difuziei a lui Fick şi al relaţiilor care exprimă interdependenţa dintre diferitele fluxuri ionice la axoni.

5. Teoria biostructurii permite valorificarea dintr-un nou punct de vedere a rezultatelor experimentale obţinute de A.L. Hodgkin şi R.D. Keynes în cercetările lor privitoare la acţiunea inhibitorilor metabolici asupra fluxurilor de sodiu la axonii giganţi de *Sepia* încărcaţi prin stimulare electrică cu sodiu radioactiv şi introduşi apoi în apă de mare.

Institutul de biochimie al Academiei Republicii Socialiste România
şi
Catedra de biochimie a Universităţii Bucureşti

Prezentată la redacţie la 14 octombrie 1968

BIBLIOGRAFIE

1. E. MACOVSCHI, St. cerc. biochim., **9**, 123 (1966).
2. K. MOND, R. AMSON, Pflügers Arch., **220**, 69 (1928).
3. E. MACOVSCHI, St. cerc. biochim., **11** (1968).
4. A. L. HODGKIN, R. D. KEYNES, J. Physiol., **128**, 28 (1955).
5. E. MACOVSCHI, St. cerc. biochim., **8**, 371 (1965).
6. R. D. KEYNES, J. Physiol., **114**, 119 (1951).
7. E. MACOVSCHI, V. FRUNZETI, St. cerc. biochim., în acest număr.

THE ACTION OF METABOLIC INHIBITORS UPON SODIUM ION EFFLUXES AND INFLUXES IN GIANT AXONS FROM *SEPIA*

Some considerations in the light of the biostructure theory

SUMMARY

A.L. Hodgkin's and R.D. Keynes' experimental findings relevant to the influence of metabolic inhibitors upon sodium ion effluxes from Sepia giant axons were examined in the light of the biostructure theory. The findings are consistent with the prediction of biostructure theory according to which metabolic inhibitors induce a partial breakdown of the biostructure and the release of a water moiety in the latter. Modifications of sodium ion concentration in axoplasm free water during this efflux, as well as water amounts which are released from axon biostructure under dinitrophenol action were calculated. Water released from biostructure joins axoplasm free water and modifies the concentration of substances dissolved in the latter. Such concentration changes could play an important part in the development of multifarious biochemical processes in the investigation of which metabolic inhibitors are used (glycolysis, oxidative phosphorylation and so on).

ST. CERC. BIOCHIM 12. 1. 19–26 (1969)

ELIBERAREA APEI ŞI A ALTOR SUBSTANŢE DIN BIOSTRUCTURA FRUNZELOR DE PORUMB SUB ACŢIUNEA INHIBITORILOR METABOLICI

E. MACOVSCHI şi V. FRUNZETI

Rezumat. — O serie de consideraţii bazate pe teoria biostructurii au permis să se prevadă unele efecte pe care inhibitorii metabolici ar trebui să le exercite asupra frunzelor vii, influenţînd cantitatea şi calitatea sucurilor ce pot fi stoarse din aceste frunze în anumite condiţii experimentale. Cercetările efectuate pe frunzele tinere de porumb au dat rezultate conform tuturor acestor prevederi. Astfel a fost adusă o dovadă directă în sprijinul existenţei biostructurii în celulele vii, demonstrîndu-se valabilitatea teoriei biostructurale.

Pentru explicarea acţiunii de încetinire exercitată de inhibitorii metabolici (dinitrofenol, cianura de sodiu, azida de sodiu) asupra efluxului ionilor de sodiu din axonii giganţi de *Sepia* încărcaţi cu sodiu radioactiv şi introduşi în apa de mare [1], am recurs la teoria biostructurii şi am admis că aceste substanţe, reducînd randamentul energetic necesar menţinerii integrităţii biostructurii din protoplasma celulelor vii, ar provoca eliberarea unei părţi din apa cuprinsă în biostructura axoplasmei. Apa eliberată s-ar adăuga la apa liberă a axoplasmei, în care sînt dizolvaţi ionii de sodiu, ar dilua această soluţie intraplasmatică şi ar micşora gradientul de concentraţie a ionilor de sodiu dintre axoni şi apa de mare, ceea ce ar avea drept consecinţă scăderea efluxului menţionat [2].

Pentru verificarea ipotezei de mai sus erau necesare însă dovezi experimentale directe, care să arate că inhibitorii metabolici acţionează la nivelul biostructurii, determinînd destrămarea ei *parţială*, urmată de eliberarea unei părţi din apă, precum şi a altor componente.

Cercetările noastre anterioare cu privire la starea apei din protoplasmă şi la originea sucurilor vegetale [3] ne permit să aducem asemenea dovezi. Într-adevăr, se ştie că frunzele încă vii, stoarse la cîteva sute de atmosfere, cedează o anumită cantitate de suc vacuolar, iar rezidul rămas după îndepărtarea acestui suc, omorît şi comprimat din nou, cedează o nouă cantitate de suc, numit suc plasmatic. Spre deosebire de alţi autori [4], [5], [6], considerăm că acest suc este alcătuit din apă şi diferite substanţe hidrosolubile ce provin din biostructura existentă în reziduul proaspăt, încă viu, dar care s-a destrămat o dată cu omorîrea acestuia. În fine, frunzele proaspete, omorîte indiferent prin ce mijloc (îngheţare prin azot lichid, încălzire la 100°C, asfixiere cu vapori de eter la temperatura obişnuită etc.), dau prin stoarcere o cantitate cu mult mai mare de suc decît frun-

zele proaspete [7], [8]. Acesta poate fi denumit „suc mixt", deoarece reprezintă un amestec de suc vacuolar şi plasmatic.

Or, dacă inhibitorii metabolici aplicaţi în doze nemortale provoacă într-adevăr destrămarea *parţială* a biostructurii, ar fi de aşteptat ca:

1) frunzele tratate cu inhibitori metabolici să cedeze, prin comprimare, mai mult suc decît frunzele martor, deoarece la sucul vacuolar s-ar adăuga şi o parte din apa provenită din destrămarea parţială a biostructurii;

2) reziduul rămas după stoarcerea frunzelor tratate cu inhibitori şi omorît apoi prin îngheţare să cedeze, prin comprimare, mai puţin suc decît reziduul frunzelor martor, deoarece o parte din apa biostructurii sale a fost eliminată o dată cu sucul vacuolar;

3) sucul obţinut prin comprimarea frunzelor tratate cu inhibitori metabolici să conţină o cantitate mai mare de componente hidrosolubile decît sucul vacuolar obţinut din frunzele martor, deoarece la componentele hidrosolubile ale sucului vacuolar s-ar adăuga şi componentele hidrosolubile provenite din destrămarea parţială a biostructurii;

4) sucul obţinut prin comprimarea reziduului rămas de la frunzele tratate cu inhibitori metabolici şi omorît prin îngheţare să conţină o cantitate mai mică de componente hidrosolubile decît sucul plasmatic obţinut din reziduul omorît al frunzelor martor, deoarece o parte din componentele hidrosolubile ale biostructurii a fost eliminată o dată cu sucul vacuolar;

5) frunzele tratate cu substanţe care nu se încadrează în categoria inhibitorilor metabolici şi care nu exercită asupra biostructurii vreo acţiune iritantă, precum şi reziduurile omorîte ale acestor frunze să dea sucuri cantitativ şi calitativ corespunzătoare celor ce se obţin din frunzele şi reziduurile martor.

Dacă toate aceste prevederi ar fi confirmate experimental, s-ar putea trage concluzia că inhibitorii metabolici acţionează la nivelul biostructurii, provocînd destrămarea ei parţială, fapt care ar demonstra existenţa biostructurii şi, implicit, valabilitatea teoriei noastre.

MATERIAL ŞI METODĂ DE LUCRU

Cercetările s-au efectuat pe plantule de porumb (Hibrid simplu 301) în vîrstă de 17—23 de zile.

Plantulele se tăiau de la colet, se legau în mănunchiuri de cîte 50,0 g şi se introduceau cu tulpinile în soluţii apoase de dinitrofenol sau azidă de sodiu cu concentraţie 10^{-3}, respectiv 10^{-2} molar. După 24 de ore, frunzele îşi mai păstrau aspectul normal, deşi pătrundeau în ele cantităţi apreciabile de inhibitori; numai tulpinile, care erau cufundate în soluţii, prezentau semne de intoxicaţie. Plantulele martor se prelucrau la fel, cu deosebire că se introduceau în apă distilată.

După 24 de ore de la începutul experienţei, plantulele se scoteau din soluţii, respectiv din apă, tulpinile se spălau cu apă distilată (fără ca apa să atingă frunzele), se uscau prin tamponare cu hîrtie de filtru şi se cîntăreau la balanţa farmaceutică. Dacă greutatea plantulelor tratate cu inhibitori nu era egală cu aceea a plantulelor martor, plantulele care cîntăreau mai mult erau lăsate să se usuce la temperatura camerei, pînă la greutatea celorlalte.

Tabela 1

Cantitatea *(V)* indicele de refracție (n_D) concentrația globală exprimată în g zaharoză % ([Z]) și conținutul în substanțe hidrosolubile, exprimat de asemenea în g zaharoză (Z), ale sucurilor obținute prin stoarcere la 150 atm atît ale frunzelor proaspete tratate cu apă (frunzele martor – M) și cu soluții de dinitrofenol (DNP) și azida de sodiu (AZNa) cît și ale celor obținute din reziduurile acestor frunze, după prealabilă omorîre prin înghețare cu zăpadă carbonică. Concentrația soluției de dinitrofenol 10^{-3} M și de azidă de sodiu 10^{-2} M. Durata tratamentului 24 de ore la 20 – 22° C

Nr. crt.	Data 1968	V ml			n_D			[Z] g/100 ml			Z g		
		M	DNP	AZNa	M	DNP	AZNa	M	DNP	AZNa	M	DNP	AZNa
		Sucul din frunze proaspete (S_1)											
1	11.IX	13	22	27	1,3342	1,3352	1,3360	0,76	1,41	1,98	0,10	0,31	0,54
2	24.IX	15	23	25	1,3349	1,3355	1,3362	1,21	1,62	2,16	0,18	0,37	0,54
3	1.X	13	21	26	1,3350	1,3362	1,3372	1,27	2,16	2,83	0,16	0,45	0,74
		Sucul din reziduu după omorîrea prin înghețare (S_2)											
1	11.IX	19	14	10	1,3410	1,3420	1,3420	5,50	6,23	6,23	1,04	0,87	0,62
2	24.IX	21	16	12	1,3405	1,3405	1,3405	5,17	5,17	5,17	1,09	0,83	0,62
3	1.X	19	11	6	1,3425	1,3430	1,3430	6,56	6,89	6,89	1,25	0,76	0,41

Apoi plantulele se storceau într-o presă hidraulică de laborator, tip Hafico, model 2 litri, prevăzută cu dispozitivul special pentru cantităţi mici de material vegetal (2 Ltr. Hafico-Hochdruckpresse mit Kleineinsatz). Presiunea se ridica treptat pînă la 150 atm şi se menţinea pînă cînd materialul înceta să mai cedeze suc (15 min erau, în general, de ajuns).

Cantitatea de suc obţinută (sucul S_1) se măsura cu cilindrul gradat şi se exprima în ml.

După centrifugare la 12 000 rot/min, timp de 30 min, se determina concentraţia globală a sucului cu refractometrul Abbe, model Carl Zeiss, Jena, şi se exprima convenţional în g zaharoză la 100 ml suc, după tabelele lui Wagner [9].

În sucurile centrifugate şi apoi diluate cu apă bidistilată în proporţie de 1/10, se determina concentraţia ionilor de potasiu, calciu şi sodiu la fotometrul cu flacără model III Carl Zeiss, Jena.

În aceleaşi sucuri, diluate în proporţie de 1:1 cu apă distilată, se doza fosforul mineral, după metoda Fiske-Subbarow [10].

Reziduul rămas în presă după stoarcerea sucului S_1 era îndepărtat, amestecat cu zăpadă carbonică sau cu azot lichid, dezgheţat şi stors din nou la aceeaşi presiune. Sucul S_2 astfel obţinut era măsurat, centrifugat şi analizat la fel ca sucul S_1.

S-au efectuat de asemenea cercetări în care, în locul soluţiilor de inhibitori metabolici, s-au folosit soluţii de zaharoză, respectiv alanină, în concentraţie de 10^{-2} M. Fiind componente curente ale celulelor vegetale, era de presupus că, în condiţiile menţionate, aceste substanţe nu vor exercita vreo acţiune iritantă asupra biostructurii din frunze.

REZULTATELE OBŢINUTE ŞI SEMNIFICAŢIA LOR

Unele valori reprezentînd cantităţile şi concentraţiile sucurilor stoarse la 150 atm din frunze proaspete tratate cu apă (martor), cu dinitrofenol

Tabela

Concentraţia şi conţinutul ionilor de potasiu, calciu şi sodiu, precum şi de fosfor anorganic ale sucurilor obţinute prin stoarde sodiu (AZNa) cît şi a celor obţinute din rezidurile acestor frunze, după prealabilă omorîre prin îngheţare cu zăpadă carbonică la 20 – 22° C Volumele sucurilor (S_1) şi (S_2)

Nr. crt.	K						Ca					
	Concentraţie mg%			Cantit. totală mg			Concentraţie mg%			Cantit. totală mg		
	M	DNP	AZNa	M	DNP	AZNa	M	DNP	AZNa	M	DNP	AZNa
	Sucurile din frunze											
1	62	74	93	8,06	16,3	25,1	11	28	25	1,43	6,16	6,75
2	75	104	106	11,3	23,9	26,5	20	35	37	3,00	8,05	9,25
3	132	172	186	17,2	36,1	48,4	58	72	62	7,54	15,1	16,1
	Sucurile de reziduri după											
1	164	187	235	31,2	26,2	23,5	38	43	42	7,22	6,02	4,20
2	269	292	238	56,5	46,7	28,6	60	52	47	12,6	8,32	5,64
3	365	430	420	69,4	47,3	25,2	80	80	70	15,2	8,80	4,20

sau cu azida de sodiu, ca şi din reziduurile acestora, după prealabila omorîre prin îngheţare, sînt prezentate în tabela 1.

Se constată că frunzele tratate cu dinitrofenol sau cu azida de sodiu cedează o cantitate mai mare de suc decît frunzele martor, tratate cu apă, şi că reziduurile frunzelor tratate cu inhibitori metabolici dau, după omorîre, o cantitate de suc mai mică decît reziduul frunzelor martor. Aceste fapte concordă cu prevederile 1 şi 2, formulate în prima parte a acestei lucrări.

Se mai constată că indicii de refracţie ai sucurilor obţinute din frunzele tratate cu dinitrofenol şi, mai ales, cu azidă de sodiu sînt mai mari decît aceia ai sucurilor obţinute din frunzele martor, ceea ce arată că primele sînt mai concentrate. Aceasta iese şi mai bine în evidenţă dacă se compară concentraţiile globale ale tuturor acestor sucuri, exprimate convenţional în g zaharoză la 100 ml suc. De altfel, date fiind cantităţile şi concentraţiile relativ mari de sucuri obţinute din frunzele tratate cu inhibitori metabolici, cantitatea de substanţe dizolvate în ele (exprimată în g zaharoză) este foarte mare comparativ cu aceea din sucul martor. La reziduurile omorîte prin îngheţare, situaţia este inversă : deşi concentraţiile sucurilor obţinute din reziduurile frunzelor tratate cu dinitrofenol sau azidă de sodiu pot fi egale, mai mici sau chiar mai mari decît ale sucului martor, totuşi, datorită faptului că aceste sucuri sînt în cantităţi relativ mici, cantitatea de substanţe hidrosolubile ce o conţin este inferioară aceleia din sucul martor. Aceste fapte concordă cu prevederile 3 şi 4.

În tabela 2 sînt prezentate unele rezultate obţinute prin dozarea cationilor de potasiu, calciu şi sodiu, precum şi a fosforului anorganic în sucurile obţinute din frunzele proaspete tratate cu apă (frunzele martor), respectiv cu dinitrofenol sau azidă de sodiu, ca şi din reziduurile rămase după stoarcerea acestor frunze şi omorîte apoi prin îngheţare.

Se constată că atît concentraţiile ionilor menţionaţi şi ale fosforului anorganic, cît şi cantităţile lor sînt mai mari în sucurile obţinute din frun-

2

cerea la 150 atm atît a frunzelor proaspete tratate cu apă (frunzele martor – M) şi cu soluţii de dinitrofenol (DNP) şi azidă bonică. Concentraţia soluţiei dinitrofenol: 10^{-3} M şi de azidă de sodiu 10^{-2} M. Durata tratamentului: 24 de ore la (S_2) sînt trecute în tabela 1

Na						P					
Concentraţie mg%			Cantit. totală mg			Concentraţie mg%			Cantit. totală mg		
M	DNP	AZNa	M	DNP	AZNa	M	DNP	AZNa	M	DNP	AZNa
proaspete (S_1)											
8,5	8,5	13	1,10	1,87	3,51	66	90	108	0,86	1,98	2,92
5,0	6,0	12	0,75	1,38	3,00	30	72	84	0,45	1,66	2,10
7,0	5,5	14	0,91	1,16	3,64	48	163	223	0,62	3,42	5,80
omorîre prin îngheţare (S_2)											
11,0	11,0	12	2,09	1,54	1,20	367	421	150	6,97	5,89	1,50
7,0	7,5	8	1,47	1,20	0,96	301	301	301	6,32	4,82	3,61
7,5	8,0	13	1,42	0,88	0,78	313	452	482	5,95	4,97	2,89

Tabela 3

Cantitatea (V) şi indicele de refracţie (n_D) a sucurilor obţinute prin stoarcerea la 150 atm atît a frunzelor proaspete tratate cu apă (frunze martor – M) şi cu soluţii de zaharoză (Z) şi alanină (Ala) cît şi a celor obţinute din reziduurile acestor frunze după prealabilă omorîre prin îngheţare cu zăpadă carbonică. Concentraţia soluţiilor de zaharoză şi alanină; 10^{-2} M. Durata tratamentului: 24 de ore la 20–22° C

Nr. crt.	Data 1968	V ml			n_D		
		M	Z	Ala	M	Z	Ala
		Sucul din frunze proaspete (S_1)					
1	18.X	21	20	20	1,3355	1,3355	1,3358
		Sucul din reziduuri după omorîre prin îngheţare (S_2)					
1	18.X	23	22	25	1,3412	1,3410	1,3410

zele tratate cu inhibitori metabolici decît în sucul martor. La reziduurile respective, situaţia se prezintă altfel: deşi concentraţia cationilor şi a fosforului anorganic în sucurile stoarse din reziduurile omorîte ale frunzelor tratate cu inhibitori pot fi mai mari sau mai mici decît în sucul reziduului martor, dat fiind că din reziduurile omorîte s-au obţinut numai cantităţi mici de sucuri, cantităţile de cationi şi cele de fosfor anorganic sînt mai mici decît în sucul martor. Aceasta concordă de asemenea cu prevederile 3 şi 4.

În cazul ionilor de sodiu, situaţia se complică, din cauză că azida de sodiu folosită ca inhibitor face să pătrundă în frunze o cantitate relativ mare de sodiu. Aceasta rezultă din faptul că atît concentraţiile, cît şi cantităţile de ioni de sodiu din sucurile obţinute din frunzele tratate cu azidă de sodiu şi din reziduurile acestora omorîte prin îngheţare depăşesc pe acelea ale sucurilor obţinute în cazul tratamentului cu dinitrofenol.

Tabela

Concentraţia şi conţinutul ionilor de potasiu, calciu şi sodiu, precum şi de fosfor anorganic ale sucurilor obţinute prin stoar nă (Ala), cît şi a celor obţinute din reziduurile acestor frunze după prealabilă omorîre prin îngheţare cu zăpadă carbonică. (S_1) şi (S_2) sînt

Nr. crt.	K						Ca					
	Concentraţia mg %			Cantitate totală			Concentraţia mg %			Cantitate totală		
	M	Z	Ala	M	Z	Ala	M	Z	Ala	M	Z	Ala
												Suc din frunze
1	67	82	63	14,1	16,7	12,6	8	10	10	1,68	2,00	2,00
												Suc din reziduu după
1	240	230	210	55,2	50,6	52,5	13	10	10	2,99	2,20	2,50

În fine, să luăm în considerație unele rezultate obținute în cazul înlocuirii soluțiilor de inhibitori metabolici prin soluții de zaharoză sau alanină, prezentate în tabelele 3 și 4. Se constată că, spre deosebire de inhibitorii menționați, aceste substanțe nu modifică apreciabil nici cantitățile de suc obținute din frunze sau din reziduurile respective, nici indicii de refracție ai sucurilor și nici conținutul lor în potasiu, calciu, sodiu și fosfor anorganic. Astfel se confirmă justețea prevederii 5.

În 1965, o dată cu elaborarea teoriei biostructurale a permeabilității celulare, am aplicat postulatele acestei teorii la interpretarea și explicarea unor date experimentale, printre care și a faptului, binecunoscut, că asimetria distribuției sodiului și potasiului între protoplasmă și lichidul interstițial (extracelular) este influențată de metabolismul celular : scăderea metabolismului sub acțiunea inhibitorilor specifici ar urma să fie însoțită de micșorarea acestei asimetrii. Astfel, am ajuns la concluzia că energia provenită din metabolism contribuie la menținerea biostructurii și că inhibarea metabolismului duce la scăderea stabilității biostructurii și la eliberarea parțială a apei și a altor componente care intră în alcătuirea acesteia [10]. Pe atunci nu dispuneam de fapte experimentale directe care să dovedească valabilitatea acestor concluzii.

Doi ani mai tîrziu, în 1967, interpretînd de pe pozițiile teoriei biostructurale rezultatele experimentale obținute de A.L. Hodgkin și R.D. Keynes [1] în cercetările lor referitoare la influența inhibitorilor metabolici asupra efluxului sodiului din axonii giganți de *Sepia*, încărcați prin stimulare electrică cu sodiu radioactiv, am reușit nu numai să aflăm prin calcul modificările concentrației ionilor de sodiu în apa liberă a axoplasmei în cursul acestui eflux, dar să calculăm și cantitățile de apă care se eliberează din biostructura axonului de *Sepia* sub acțiunea dinitrofenolului [2]. Aceasta era o dovadă indirectă în sprijinul valabilității teoriei biostructurii.

Acum, pe baza concluziilor desprinse din cele două lucrări menționate [10] și [2], am prevăzut unele efecte pe care inhibitorii metabolici ar urma să le exercite asupra cantității și calității sucurilor care pot fi stoarse din frunzele vii ale plantelor în anumite condiții experimentale.

cerea la 150 atm atit a frunzelr proaspete tratate cu apă (frunzele martor – M) și cu soluții de zaharoză (Z) și alani- Concentrația soluțiilor de zaharoză și alanină: 10^{-2} M. Durata tratamentului: 24 de ore la 20 – 22°C. Volumele sucurilor trecute în tabela 3

Na						P					
Concentrația mg %			Cantitate totală			Concentrația mg %			Cantitate totală		
M	Z	Ala	M	Z	Ala	M	Z	Ala	M	Z	Ala
proaspete (S_1)											
2,0	2,7	1,8	0,42	0,54	0,36	6,0	6,0	6,0	0,13	0,12	0,12
omorîre prin înghețare (S_2)											
2,5	6,0	4,0	0,58	0,13	0,10	247	247	247	5,68	5,43	6,17

Aceste efecte nu pot fi prevăzute pe baza concepţiilor actuale cu privire la natura viului. Faptul că rezultatele cercetărilor experimentale au confirmat întru totul aceste prevederi poate fi privit ca o dovadă directă a valabilităţii teoriei biostructurale.

CONCLUZII

Prezenta lucrare, împreună cu unele din lucrările precedente [10], [2], formează o bază experimentală care demonstrează prezenţa biostructurii în celulele vii; existenţa acesteia a fost prevăzută încă din 1958 [11] pe baza unor consideraţii filozofice şi teoretice.

Institutul de biochimie al
Academiei Republicii Socialiste România

Prezentată la redacţie la 30 octombrie 1968

BIBLIOGRAFIE

1. A. L. Hodgkin, R. D. Keynes, J. Physiol., **128**, 28 (1955).
2. E. Macovschi, St. cerc. biochim. (sub tipar).
3. E. Macovschi, I. Marineanu, Rev. roum. Biochim., **4**, 235 (1967).
4. T. Mason, E. Phillis, Ann. Bot. N.S., **3**, 531 (1939).
5. J. A. Medvedev, Sen Tzian-Sea, Biohimia, **24**, 709 (1959).
6. J. A. Medvedev, N. N. Zabolotskii, Sen Tzian-Sea, Mo Si-Mu, E. G. Davidova, E. P. Davidov, Biohimia, **25**, 1001 (1960).
7. H. Dixon, W. Atkins, Sci. Proc. roy. Dub. Soc., **13**, 422 (1913).
8. A. C. Chibnall, J. biol. Chem., **55**, 333 (1923).
9. B. Wagner, Tabellen zum Eintauchrefraktometer Sonderhausen, 1907, p. VIII şi 46.
10. E. Macovschi, St. cerc. biochim., **8**, 396 şi 397 (1965).
11. E. Macovschi, Săptămînalul Contemporanul, 34/1958; *Materialismul dialectic şi ştiinţele contemporane ale naturii*, Edit. politică, Bucureşti (1959), p. 155; Revue de Chimie, **4**, 11 (1959).

THE RELEASE OF WATER AND OF OTHER SUBSTANCES FROM THE BIOSTRUCTURE OF MAIZE LEAVES UNDER THE ACTION OF METABOLIC INHIBITORS

SUMMARY

Several considerations on the ground of biostructure theory allowed the prediction of some effects that metabolic inhibitors would exert upon living leaves, by affecting the amount and the quality of saps which can be expressed from these leaves, under certain experimental conditions. Investigations performed on maize young leaves yielded results consistent with these predictions. In this way a direct evidence supporting the existence of biostructure within living cells was given, also demonstrating the validity of biostructure theory.

ST. CERC. BIOCHIM., 12, 1, 27—34 (1969)

ELECTROFOREZA ŞI IMUNOELECTROFOREZA PROTEINELOR DIN FRUNZELE DE PORUMB ŞI DE ALTE CEREALE

VICTORIA ALEXANDRESCU şi IOANA CĂLIN

Rezumat. — Proteinele din frunzele de porumb, grîu, orz, ovăz, secară s-au separat electroforetic în 6 — 8 fracţiuni, după specie ; cele din frunzele de porumb conţin fracţiuni încărcate mai electronegativ. Pentru proteinele din porumb nu s-au constatat deosebiri în aspectul electroforegramelor, dacă erau sau nu delipidate sau dacă făceau parte din varietăţi diferite. În frunzele de porumb s-au evidenţiat 11 antigene, dintre care 6 sînt comune cu cele din frunzele celorlalte cereale păioase. S-a arătat prezenţa în frunzele de porumb a unor antigene comune cu cele din formaţiunile seminţei în repaus sau după germinaţie. Absorbţia încrucişată a celor două antiseruri nu relevă diferenţe între varietăţile cercetate. Delipidarea cu butanol nu schimbă tabloul anticorpilor formaţi în totalitatea lor.

Aplicarea tehnicilor de imunoelectroforeză în investigarea proteinelor din plante prezintă interes pentru caracterizarea lor în dezvoltarea ontogenetică şi în evoluţia filogenetică. Una din plantele care s-a bucurat de atenţia cercetătorilor este porumbul. Astfel, i s-au cercetat proteinele cu caracter antigenic care afectează sinteza amidonului din endospermul în formare [1], proteinele din sămînţă [2], [3], din formaţiunile seminţei în repaus [4]—[6] sau după germinaţie [7], [8] şi din polen [9]—[12].

În lucrarea de faţă am cercetat prin metoda electroforezei şi imunoelectroforezei în gel de agar proteinele solubile din frunzele de porumb (*Zea mays*) în etapa de plantă cu 4—5 frunze. Paralel, am urmărit să vedem dacă pe această cale se pot pune în evidenţă caractere specifice celor două varietăţi de porumb pe care am lucrat, *indentata* şi *indurata*, precum şi acţiunea butanolului asupra antigenelor. Cu ajutorul serului imun antifrunză am urmărit de asemenea antigenele comune frunzei şi formaţiunilor seminţei în repaus sau după 5—7 zile de la germinaţie. În sfîrşit, pentru a avea o vedere de ansamblu asupra mobilităţii electroforetice şi a înrudirii antigenice a proteinelor din frunzele de porumb faţă de cele existente în frunzele altor cereale (monocotiledonate), am cercetat şi comportarea electroforetică a proteinelor din frunzele de grîu, orz, ovăz, secară, iar cu ajutorul antiserurilor obţinute faţă de proteinele din frunzele de porumb antigenele comune.

MATERIALE ŞI METODE

S-a lucrat pe frunze de porumb din soiurile Românesc de Studina, din varietatea *indurata*, şi ICAR—54, din varietatea *indentata*, în etapa de plantă cu 4—5 frunze. Plantele au fost crescute în condiţii de seră

şi de cîmp; într-o lucrare anterioară [13] s-a arătat că proteinele din frunzele plantelor crescute în cele două condiţii se comportă asemănător din punct de vedere electroforetic. Celelalte cereale au fost crescute în condiţii de laborator şi frunzele au fost folosite după două săptămîni de la semănare.

Proteinele solubile din frunze (porumb, grîu, orz, ovăz, secară) s-au extras într-un amestec, în volume egale, de tampon de acid boric-borax, pH = 8,6, şi soluţie de clorură de sodiu 15%, în raportul 1g material/0,5 ml extractant; s-a îngheţat şi dezgheţat de două ori şi s-a mojarat pentru distrugerea membranelor celulare. Materialul s-a stors prin tifon şi s-au adăugat 1—2 vol. butanol, pentru extracţia lipidelor şi a clorofilei. Amestecul s-a agitat puternic 10 min şi s-a centrifugat 10 min la 1500 g. Extractul rezultat (din partea inferioară a eprubetelor de centrifugă) s-a supus dializei faţă de apă distilată, timp de 16 ore, apoi s-a concentrat prin perevaporare sau s-a liofilizat. Preparatul proteic liofilizat conţinea aproximativ 70% proteină şi în text va fi numit „preparat proteic delipidat".

S-a făcut şi extracţia proteinelor din frunzele de porumb în soluţie de clorură de sodiu 9‰ fără extracţia cu butanol a lipidelor şi clorofilei, restul operaţiilor fiind identice. Acest preparat va fi numit „preparat proteic nedelipidat".

Imunizarea iepurilor. Pentru fiecare din cele două varietăţi de porumb cu care s-a lucrat s-au folosit cîte doi iepuri, cărora li s-a administrat preparat proteic delipidat, liofilizat, aproximativ 200 mg/animal, divizat în 10—14 injecţii. Ca adjuvant s-a folosit hidroxidul de aluminiu, iar sterilitatea materialului s-a asigurat prin adăugarea de streptomicină şi penicilină. Titrul precipitant, determinat prin metoda Uhlenhut, a fost de 0,5 μg proteină/ml.

Pentru a urmări acţiunea butanolului am imunizat iepuri şi cu preparat proteic nedelipidat, obţinut din frunze de porumb Românesc de Studina.

Electroforeza proteinelor s-a efectuat în soluţie tampon de acid boric 0,2 M—borax 0,05 M, pH = 8,6, gelul de agar a fost făcut în acelaşi tampon, diluat cu 2 vol. apă distilată, pe plăci de 7,5 × 2,5 cm, la o diferenţă de potenţial de 200 V, cu intensitatea curentului de 1 mA/cm, timp de o oră şi 15 min. Concentraţia proteinelor supuse electroforezei a fost de 1%. Probele pentru imunoelectroforeză, după tăierea şanţurilor laterale şi introducerea serurilor, s-au ţinut o zi în camera umedă pentru difuzie, s-au spălat 4—5 zile cu soluţie tampon de fosfaţi de sodiu 0,02 M, pH = 8, care conţinea şi 9‰ clorură de sodiu. După uscare lentă s-au colorat cu amidoschwarz [14].

S-a lucrat şi cu *seruri absorbite.* Absorbţia s-a făcut astfel: la 2 ml ser s-a adăugat preparat proteic liofilizat (raţii de 10—1 mg) pînă la precipitarea completă, verificată prin metoda Ouchterlony. După fiecare adăugare de proteină, serul s-a ţinut o oră la 37°C şi 16 ore la + 4°C şi s-a centrifugat la 3500 g.

Serul de iepure nu dă reacţii de precipitare cu proteinele din frunzele de porumb.

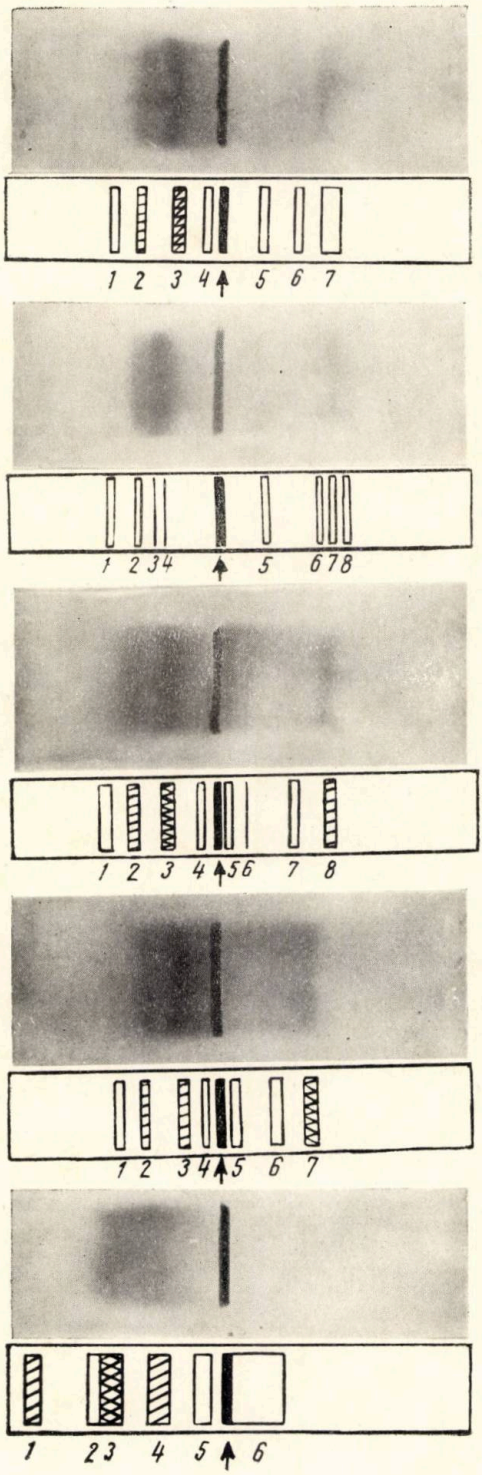


Fig. 1. — Electroforegrama în gel de agar a proteinelor solubile din frunzele de porumb (*a*), grîu (*b*), orz (*c*), ovăz (*d*), secară (*e*).

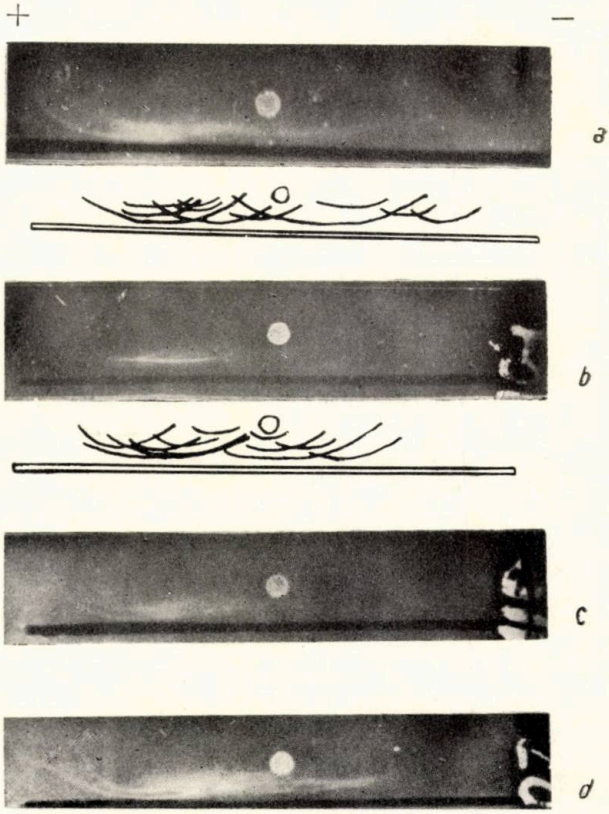


Fig. 2. — Imunoelectroforegrama proteinelor solubile din frunzele de porumb :

a — proteinele extrase cu soluție tampon de acid boric-borax cu adaos de clorură de sodiu și delipidate cu butanol cu serul imun omolog; *b* — proteinele extrase cu clorură de sodiu cu serul imun omolog; *c* — proteinele extrase cu soluție tampon de acid boric-borax cu adaos de NaCl și delipidate cu butanol cu serul imun antiproteină extrasă în clorură de sodiu; *d* — proteinele extrase în clorură de sodiu cu serul imun antiproteină extrasă în soluție tampon de acid boric-borax cu adaos de NaCl și delipidată cu butanol.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Electroforeza în gel de agar. În condiţiile noastre de lucru, preparatul proteic delipidat din frunzele de porumb s-a separat în 6 fracţiuni, 5 repartizate de la start spre anod, iar spre catod se evidenţiază o coloraţie mai slabă, care arată prezenţa proteinelor şi în această parte (fig. 1).

Faţă de punctul zero de migrare al electroforegramei, determinat cu ajutorul amidonului, se constată că fracţiunile sînt încărcate electronegativ. Mobilitatea fracţiunilor 1—5 şi limita zonei proteice dinspre catod sînt redate în tabelă şi sînt cuprinse între valorile $3{,}42 \cdot 10^{-5}$ şi

Tabelă

Mobilitatea electroforetică a fracţiunilor proteice din cîteva cereale

Porumb		Grîu		Orz		Ovăz		Secară	
fracţiunea	mobilitatea $X.10^{-5}$ $cm^2/s/V$	fracţiunea	mobilitatea $X.10^{-5}$ $cm^2/s/V$	fracţiunea	mobilitatea $X.10^{-5}$ $cm^2/s/V$	fracţiunea	mobilitatea $X.10^{-5}$ $cm^2/s/V$	fracţiunea	mobilitatea $X.10^{-5}$ $cm^2/s/V$
1	3,42	1	2,25	1	2,42	1	2,38	1	2,34
2	2,67	2	1,92	2	2,08	2	2,04	2	2,00
3	2,46	3	0,95	3	1,67	3	1,83	3	0,96
4	1,87	4	0,93	4	0,93	4	1,67	4	0,93
5	1,29	5	0,83	5	0,87	5	0,40	5	0,50
6	0,33	6	0,33	6	0,66	6	−0,25	6	0,04
		7	−0,083	7	0,045	7	−0,37	7	−0,37
				8	−0,37	8	−0,58		

$0{,}33 \cdot 10^{-5}$ $cm^2/s/V$. Faţă de valorile pe care le prezenta axul embrionar în repaus ($0{,}27—2{,}64 \cdot 10^{-5}$ $cm^2/s/V$) sau după 5—7 zile de la germinaţie ($0{,}38 — 4{,}40 \cdot 10^{-5}$ $cm^2/s/V$) [7], se constată că proteinele din frunze au o mobilitate electroforetică intermediară. Cu toate acestea, într-o lucrare anterioară [15] s-au pus în evidenţă izoperoxidaze care dovedesc prezenţa proteinelor şi dincolo de limitele pe care le-am evidenţiat noi cu ajutorul colorantului amidoschwarz, şi anume în partea catodică a plăcii, dincolo de punctul zero de migrare, ceea ce denotă prezenţa în extractele din frunze a proteinelor încărcate electropozitiv. Menţionăm că aceste fracţiuni proteice electropozitive nu s-au putut evidenţia nici prin electroforeza pe hîrtie [13].

Între cele două preparate proteice, delipidat şi nedelipidat, obţinute din frunzele de porumb nu am putut observa deosebiri în ceea ce priveşte numărul de fracţiuni sau mobilitatea lor.

Proteinele celor două varietăţi de porumb cercetate se comportă asemănător, neobservîndu-se diferenţe calitative.

Separarea electroforetică a preparatelor proteice delipidate din frunzele de grîu, orz, ovăz, secară este redată în figura 1, iar mobilităţile electroforetice ale fracţiunilor evidenţiate sînt prezentate în tabelă. Astfel, am pus în evidenţă pentru proteinele din frunzele de grîu şi secară 7 fracţiuni, iar pentru cele din orz şi ovăz 8 fracţiuni.

Faţă de proteinele din frunzele de porumb, cele din frunzele celorlalte cereale cercetate sînt mai slab încărcate electronegativ; în schimb se

evidenţiază net proteine încărcate electropozitiv, grîul, orzul, secara avînd o fracţiune, iar ovăzul 3 fracţiuni electropozitive. O altă caracteristică o constituie faptul că ele se separă în fracţiuni mult mai strîns delimitate decît cele din porumb, care prezintă între ele un fond proteic pronunţat ce îngreuiază delimitarea lor.

Imunoelectroforeza proteinelor solubile. Analiza imunoelectroforetică a preparatelor proteice delipidate obţinute din frunzele de porumb din cele două soiuri, fiecare faţă de serul omolog, a pus în evidenţă 11 linii de precipitare (fig. 2*a*). Am constatat diferenţe în intensitatea liniilor de precipitare, atît pentru acelaşi soi, cît şi între soiuri, ca urmare a reacţiei diferite a animalelor la antigenele injectate, dar nu am putut evidenţia, prin absorbţia încrucişată a antiserurilor obţinute, prezenţa de antigene specifice soiurilor, respectiv varietăţilor cercetate.

Raportul antigenic dintre proteinele porumbului în diferite etape de creştere şi dezvoltare poate aduce date interesante asupra metabolismului proteic. În lucrări anterioare am arătat prezenţa în frunză a unor antigene din formaţiunile seminţei în repaus sau după 5—7 zile de la germinaţie [4]—[7]. De aceea am cercetat înrudirea antigenică atît prin reacţii imunoelectroforetice directe între proteinele respective şi serul imun antifrunză, cît şi cu ajutorul absorbţiei antiserului nostru cu preparate proteice din formaţiunile seminţei în etapele de dezvoltare care ne interesează.

Astfel, proteinele din axul embrionar al seminţei pun în evidenţă cu serul imun antifrunză formarea a 7 linii de precipitare (fig. 3).

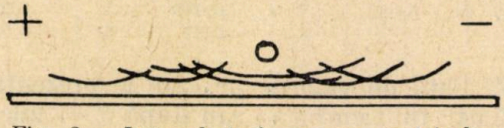


Fig. 3. — Imunoelectroforegrama proteinelor din axul embrionar al seminţei cu serul imun antifrunză.

Analiza directă a proteinelor scutelului seminţei cu antiserul nostru pune în evidenţă 6 linii de precipitare (fig. 4), iar în cazul endospermului 2 linii de precipitare (fig. 5).

Fig. 4. — Imunoelectroforegrama proteinelor din scutelul seminţei cu serul imun antifrunză.

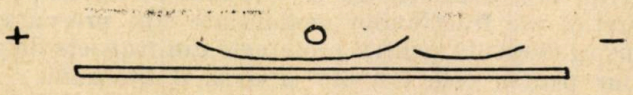


Fig. 5. — Imunoelectroforegrama proteinelor din endospermul seminţei cu serul imun antifrunză.

După 5—7 zile de la germinație, la analiza imunoelectroforetică a proteinelor axului embrionar cu serul imun antifrunză se formează 11 linii de precipitare (fig. 6).

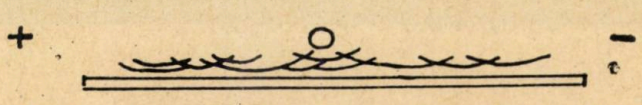


Fig. 6. — Imunoelectroforegrama proteinelor din axul embrionar germinat cu serul imun antifrunză.

În cazul proteinelor obținute din scutel după germinația seminței și supuse imunoelectroforezei cu antiserul nostru apar 8 linii de precipitare (fig. 7), iar în cazul proteinelor din endosperm 4 linii de precipitare (fig. 8).

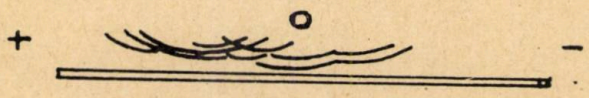


Fig. 7. — Imunoelectroforegrama proteinelor din scutel după germinarea seminței cu serul imun antifrunză.

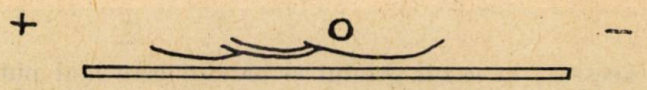


Fig. 8. — Imunoelectroforegrama proteinelor din endosperm după germinarea seminței cu serul imun antifrunză.

Liniile de precipitare obținute la analiza imunoelectroforetică directă a proteinelor seminței, înainte sau după germinație, cu serul imun antifrunză sînt în general foarte fine.

Încercarea de a cerceta înrudirea antigenică dintre frunze și formațiunile seminței prin absorbția antiserului nostru nu ne-a dus la rezultate concordante cu cele obținute prin imunoelectroforeza directă. Astfel, absorbția separată a serului antifrunză cu proteină din axul embrionar, din scutelul sau din endospermul seminței arată prezența unui singur antigen comun, același în toate cazurile pe cînd la reacția directă am obținut 7, 6, respectiv 2 linii de precipitare. Lucrînd cu proteină extrasă din formațiunile seminței după 5—7 zile de la germinație, am constatat că axul embrionar și scutelul conțin cîte 4 antigene comune cu cele din frunză, iar endospermul doar unul, pe cînd la reacția directă am obținut, după cum am arătat, un număr de 11, 8 respectiv 4 linii de precipitare.

Această neconcordanță dintre cele două metode arată că în cazul de față absorbția încrucișată epuizează numai o parte din anticorpii care pot reacționa în reacția omologă și, astfel, imaginile imunoelectroforetice cu serurile absorbite apar doar parțial modificate. Avem deci de-a face cu o identitate parțială între speciile moleculare cercetate care, alături de grupările determinante specifice, au și grupări determinante comune.

Pentru stabilirea antigenelor comune, inclusiv cele specifice de organ, între frunzele de porumb și de alte cereale, am lucrat cu proteinele

extrase din frunze de grîu, orz, ovăz, şi secară. Analiza imunoelectroforetică a acestor proteine cu serul imun antifrunză de porumb a pus în evidenţă 6 linii fine de precipitare, aranjate practic la fel în toate cazurile (fig. 9).

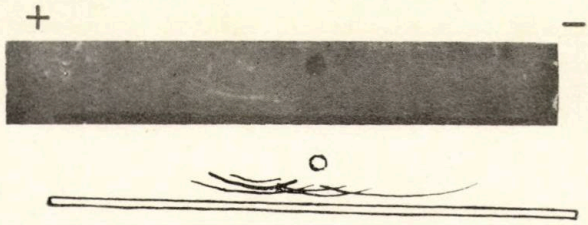


Fig. 9. — Imunoelectroforegrama proteinelor din frunzele de grîu cu serul imun antifrunză de porumb.

Dintre acestea, în cazul grîului şi orzului este mai puternică linia din mijlocul grupului celor trei linii paralele dinspre anod, în cazul ovăzului se observă o oarecare accentuare a liniei dinspre mijlocul plăcuţei din acelaşi grup şi, în sfîrşit, în cazul secarei liniile se prezintă mai uniform.

Datele obţinute arată deci că 6 din cele 11 linii de precipitare evidenţiate de noi pentru antigenele frunzelor de porumb sînt comune frunzelor acestor cereale.

Menţionăm că numărul de 11 antigene pentru frunzele de porumb şi cel de 6 antigene comune între cerealele cercetate au fost obţinute în majoritatea experienţelor efectuate. În unele cazuri, acest număr a fost depăşit, însă intensitatea liniilor era aşa de slabă, încît am renunţat a le aduce în discuţie.

Acţiunea delipidării preparatului proteic cu butanol asupra antigenicităţii lui. Analiza imunoelectroforetică a preparatului proteic nedelipidat, faţă de antiserul omolog, evidenţiază 11 linii de precipitare (fig. 2 *b*), ca şi în cazul reacţiei omologe dintre preparatul proteic delipidat şi antiserul respectiv (fig. 2 *a*).

Aspectul imunoelectroforegramelor este diferit în cele două cazuri, dar anticorpii formaţi sînt identici, deoarece prin absorbţia încrucişată a celor două antiseruri precipită toţi anticorpii.

Analiza imunoelectroforetică încrucişată dintre preparatul proteic delipidat şi serul imun antiproteină nedelipidată prezintă aspectul din figura 2 *c*, iar în cazul preparatului proteic nedelipidat şi al serului antiproteină delipidată aspectul din figura 2 *d*.

Era de aşteptat ca la analiza încrucişată aspectul liniilor de precipitare să fie determinat de antigenele analizate (delipidate sau nedelipidate). Se constată însă că aspectul ultimelor două imunoelectrofore-

grame este diferit de cel obținut în cazul reacțiilor omologe, tinzînd să arate influența antiserului în formarea lor. Această comportare ne conduce la ipoteza că preparatele proteice folosite (delipidate și nedelipidate) își reflectă diferit antigenicitatea lor asupra centrelor de formare a anticorpilor prin etalarea cu precădere a unora sau a altora din grupurile lor determinante. Această comportare a antigenelor a determinat formarea liniilor de precipitare diferit, selectiv, chiar dacă prin metoda absorbției am arătat că cele două seruri imune au în totalitatea lor anticorpi cu aceleași zone de combinare. Nu este exclusă, dar este mai puțin probabilă, ipoteza că serurile imune obținute au capacități diferite de a reacționa cu antigenele respective.

CONCLUZII

1. Analiza electroforetică a pus în evidență atît pentru proteinele din frunzele de porumb, cît și pentru cele de cereale păioase, mai multe fracțiuni proteice (6—8, după specie).

2. Față de proteinele celorlalte cereale, cele din frunzele de porumb conțin fracțiuni încărcate mai electronegativ.

3. Preparatele proteice delipidate și nedelipidate din frunzele de porumb se comportă asemănător în ceea ce privește numărul de fracțiuni și mobilitatea lor.

4. Proteinele frunzelor celor două varietăți de porumb cercetate se comportă asemănător din punct de vedere electroforetic.

5. S-au evidențiat în frunzele de porumb 11 antigene, dintre care 6 sînt antigene comune cu cele din frunzele de cereale păioase.

6. S-a arătat prezența în frunzele de porumb a unor antigene comune cu cele din formațiunile seminței în repaus sau după germinație; majoritatea acestor antigene ar fi însă specii moleculare care, alături de grupările determinante specifice, au și grupări determinante comune.

7. Absorbția încrucișată a celor două antiseruri, obținute cu preparate proteice din cele două varietăți cercetate, arată identitatea lor.

8. Delipidarea cu butanol a preparatelor proteice folosite în obținerea antiserurilor nu schimbă tabloul anticorpilor formați, sub aspectul zonelor de combinare, dar probabil că antigenele își reflectă diferit antigenicitatea lor, ceea ce duce la un aspect diferit al imunoelectroforegramelor.

Institutul de biochimie
al Academiei Republicii Socialiste România,
Laboratorul de metabolismul plantelor

Prezentat la redacție la 30 septembrie 1968

BIBLIOGRAFIE

1. D. Schwartz, Genetics, **45**, 1419 (1960).
2. T. Machida, S. Sakaguchi, Japan Agricultural Research Quarterly, **2**, 11 (1967).
3. R. Djurtoft, Seventh International Congress of Biochemistry Abstracts V, J. 222, p. 1002, Tokio, 1967.

4. V. ALEXANDRESCU, St. cerc. biochim., **10**, 301 (1967).
5. V. ALEXANDRESCU, St. cerc. biochim., **11**, 233 (1968).
6. V. ALEXANDRESCU, St. cerc. biochim., **11** (1968).
7. V. ALEXANDRESCU, I. CĂLIN, St. cerc. biochim., **11**, 239 (1968).
8. V. ALEXANDRESCU, I. CĂLIN, St. cerc. biochim., **11** (1968).
9. K. URANO, Proc. Crop. Sci. Soc. Japan, **24**, 4 (1955).
10. S. SAKAGUCHI, SABCO Journal, **1**, 188 (1965).
11. K. URANO, S. SAKAGUCHI, S. ARAI, Jap. J. Breeding, **15**, 7 (1965).
12. K. URANO, S. SAKAGUCHI, T. MACHIDA, Jap. J. Breeding, **15**, 158 (1965).
13. V. ALEXANDRESCU, Rev. roum. Biochim., **2**, 115 (1965).
14. P. GRABAR, P. BURTIN, *Analyse immuno-électrophorétique. Ses applications aux liquides biologiques*, Masson, Paris, 1960, p. 38.
15. V. ALEXANDRESCU, D. POPOV, Rev. roum. Biochim., **5**, 97 (1968).

ELECTROPHORESIS AND IMMUNOELECTROPHORESIS OF PROTEINS IN LEAVES OF MAIZE AND OTHER CEREALS

SUMMARY

Proteins in leaves of maize, wheat, barley, oat and rye were electrophoretically separated into 6—7 fractions, according to the species; those of maize leaves contain more electronegative charged fractions. In maize proteins no differences in electrophoregram patterns were found whether extracts were defatted or not or according to their belonging to different varieties.

Eleven antigens were identified in maize leaves; six of them are common to those of other stalky cereals leaves. The presence in maize leaves of some antigens, common to those from seed formations before and after germination was shown. The cross-absorption of the two antisera does not reveal differences between the investigated varieties. Butanol delipidation does not change the whole antibody pattern.

ST. CERC. BIOCHIM. 12, 11, 35–40 (1969)

EFECTUL CORTICOSTEROIZILOR ASUPRA IZOENZIMELOR LACTICODEHIDROGENAZEI, MALICODEHIDROGENAZEI ŞI ALDOLAZEI DIN MUSCULATURA STRIATĂ *

DITA COTARIU şi MIHAIL ŞERBAN

Rezumat. — S-a studiat efectul tratamentului prelungit cu cortizon sau dezoxicorticosteron (DOC) asupra modelului izoenzimatic, precum şi asupra activităţii lacticodehidrogenazei (LDH), malicodehidrogenazei (MDH) şi aldolazei din muşchiul striat de şobolan. S-a stabilit că DOC induce modificări ale modelului izoenzimatic LDH, interesînd tipurile de fracţiuni cu mobilitatea electroforetică cea mai mare şi a căror activitate scade. El determină şi o diminuare a activităţii LDH şi a aldolazei, în special după un tratament prelungit. Cortizonul are un efect inhibitor temporar asupra activităţii LDH şi o acţiune netă de intensificare a activităţii aldolazei. Se discută semnificaţia modificărilor semnalate.

Corticosteroizii administraţi animalelor de laborator induc apariţia unor modificări morfologice, fiziologice şi biochimice ale musculaturii striate. Astfel, se semnalează efectele dezoxicorticosteronului asupra glicolizei [1], nivelelor glicogenului şi acidului lactic, consumului de oxigen şi activităţii unor enzime [2], precum şi asupra electroliţilor [3] din muşchiul striat de mamifere. Glucocorticosteroizii produc, de asemenea, modificări ale metabolismului proteic [4], glicogenului [5] şi activităţii unor enzime [6] din muşchiul striat. Mai mult, aplicaţi în doze mari sau după administrări prelungite, ei induc apariţia unui proces miopatic al musculaturii scheletice [7], [8].

Cercetările biochimice menţionate mai sus au pus în evidenţă existenţa unor modificări cantitative, sub efectul administrării de corticosteroizi. Studiul izoenzimelor permite, în acelaşi timp, şi o abordare calitativă a dereglărilor metabolismului muscular, survenite în urma tratamentului cu aceste substanţe. Pentru acest motiv, în lucrarea de faţă ne-am propus să studiem unele izoenzime de primă importanţă pentru metabolismul energetic al muşchiului (lacticodehidrogenaza—LDH, malicodehidrogenaza—MDH, aldolaza), precum şi activitatea acestora la animale supuse unui tratament prelungit cu gluco-, respectiv mineralocorticosteroizi.

---

*Asistenţa tehnică Tr. Benţia.

MATERIAL ŞI METODE

Experienţele s-au efectuat pe şobolani albi Wistar, în greutate de 175—180 g, normali sau cărora li s-a administrat intramuscular, zilnic, timp de 15 zile, cortizon în doză de 14 mg/kg corp, respectiv dezoxicorticosteron (DOC) în doză de 6 mg/kg corp. Animalele tratate au fost sacrificate după 5, 10, respectiv 15 zile. O dată cu animalele tratate conform schemei menţionate, se sacrificau, pentru fiecare din variantele experimentale, şi cîte 2—3 şobolani normali, care serveau ca martori.

Muşchii gastrocnemieni prelevaţi imediat după sacrificarea animalelor erau omogenizaţi în tampon TRIS—HCl 0,05 M, pH 7,6. Raportul de extracţie a proteinelor sarcoplasmatice a fost de 3/1 v/g. Omogenatul se menţinea o oră la +4°C, după care era centrifugat la 22 000 g, timp de 30 min (+4°C). Supernatantul obţinut, cu o concentraţie proteică de 1,8—2 g% ml, era supus electroforezei în gel de amidon, în sistem discontinuu, după varianta Poulik [9]. S-au aplicat un curent de 2,6 mA/cm şi o tensiune de 14 V/cm, durata de migrare fiind de 120—150 min.

Detectarea şi identificarea izoenzimelor LDH şi MDH s-au făcut cu ajutorul tehnicii cu săruri de tetrazoliu [10], [11], [12], [13], iar ale izoenzimelor aldolazei folosindu-se o metodă de colorare bazată pe reducerea rapidă a azotatului de argint alcalin de către produşii de cataliză ai enzimei [14], [15].

Determinarea activităţii lacticodehidrogenazei s-a efectuat spectrofotometric, urmărind la 340 mμ oxidarea NADH în prezenţa piruvatului. Rezultatele calculate în unităţi Wroblewski [16] şi raportate la 1 mg proteină sînt exprimate procentual faţă de valorile normale.

Determinarea activităţii aldolazei s-a făcut după Sibley şi Lehninger [17], folosind ca substrat fructozo-1,6-difosfat 0,05 M. Rezultatele sînt exprimate în μM FDP scindaţi/mg proteină/oră la +37°C. Dozarea fosforului s-a făcut după metoda Fiske-Subbarow [18].

Reactivi. S-a lucrat cu cortizon-acetat în suspensie apoasă (Biofarm), dezoxicorticosteron în soluţie uleioasă (ADC, Biofarm), amidon hidrolizat (Serva), tetranitroblue tetrazoliu (Serva), fenazinmethosulfat (Serva), NAD şi NADH (Merck), fructozo-1,6-difosfat/sare de sodiu (Serva). Toţi ceilalţi reactivi au fost p.a.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Datele obţinute indică faptul că atît dezoxicorticosteronul (DOC), cît şi cortizonul induc anumite modificări ale unor sisteme enzimatice din muşchiul gastrocnemian de şobolan, modificări care depind de tipul hormonului administrat şi de durata tratamentului.

În figura 1 sînt prezentate spectrele electroforetice ale izoenzimelor lacticodehidrogenazei (LDH) din muşchiul gastrocnemian de şobolan tratat cu DOC, în comparaţie cu acelea din muşchiul normal. După cum reiese din figură, la muşchii trataţi apar modificări ale modelului izoenzimatic, interesînd raporturile cantitative dintre diferitele tipuri de izoenzime cu migrare anodică. Astfel, chiar numai după 5 zile de administrare

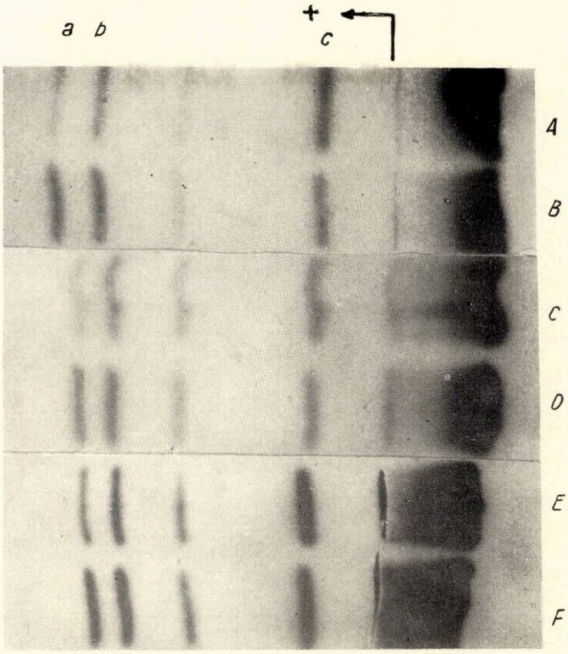


Fig. 1. — Izoenzimele lacticodehidrogenazei din mușchi. Martori : *B*, *D*, *F*. Tratament cu dezoxicorticosteron : *A* — 5 zile ; *C* — 10 zile ; *E* — 15 zile.

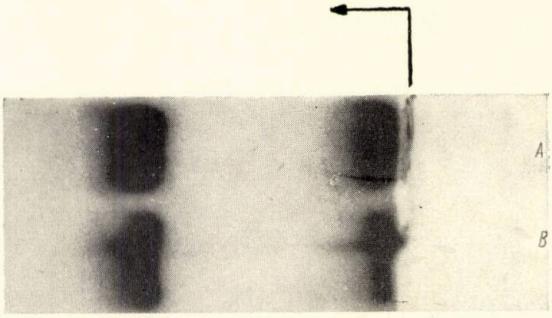


Fig. 2. — Izoenzimele malicodehidrogenazei (sarcoplasmatice) din mușchi. Martor : *A*. Tratament cu DOC : *B* — 10 zile.

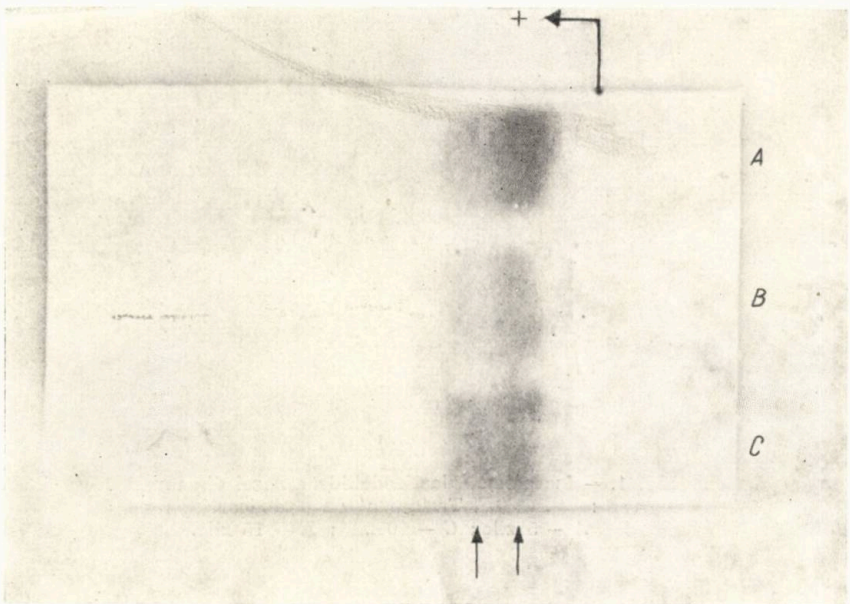


Fig. 3. — Izoenzimele aldolazei din mușchi. Martor : *A*. Tratament cu dezoxicorticosteron : *B* — 5 zile ; *C* — 10 zile.

a DOC (fig. 1 *A*) se constată o scădere a intensității tipurilor de izoenzime LDH cu mobilitatea electroforetică cea mai mare (*a*, *b*); această modificare indusă de DOC, apare atît în raport cu fracțiunile corespunzătoare ale modelului izoenzimatic al martorului, cît și în raport cu fracțiunea (*c*). După cum se constată din figurile 1 *C* și 1 *E*, sub acțiunea DOC, repartiția activității enzimatice pe tipurile de izoenzime LDH se menține modificată și după 10, respectiv 15 zile de tratament. Aceste diferențe apar evidente și din prelucrarea cantitativă a curbelor de integrare. Astfel, din tabela 1 rezultă că tipurile de izoenzime (*a*) și (*b*) prezintă o scădere

Tabela 1

Valorile procentuale * ale tipurilor de izoenzime LDH *(a)*, *(b)* și *(c)* din mușchiul gastrocnemian de șobolan normal și tratat cu DOC, la diferite intervale de timp

Tratat / Martor	Tipuri de izoenzime LDH		
	(*a*)	(*b*)	(*c*)
DOC — 5 zile	4	6	22
Martor	14	15	10
DOC — 10 zile	2	4	19
Martor	7	8	10
DOC — 15 zile	2	3	19
Martor	12	12	14

* Toate rezultatele reprezintă media a trei determinări

netă la animalele tratate în comparație cu lotul martor. Din aceeași tabelă reiese totodată și tendința de creștere a tipului (*c*) la animalele tratate comparativ cu cele martor. Se poate vorbi deci chiar de o ușoară deplasare a activității enzimatice, de pe fracțiunile frontale spre fracțiunea (*c*), aceasta devenind mai intensă pe toată durata acțiunii DOC, în comparație cu aceeași fracțiune din mușchiul animalelor martor. Ca o caracteristică constantă, fracțiunea (*a*) rămîne scăzută în raport cu martorul pe toată perioada administrării DOC. Această diferență apare și mai evidentă dacă izoenzimele (*a* și *b*) se compară între ele, atît la martor, cît și la animalele tratate. Astfel, pe cînd în primul caz cele două fracțiuni izoenzimatice frontale prezintă practic o aceeași intensitate, în schimb, sub acțiunea DOC fracțiunea (*a*) devine mai puțin intensă nu numai față de cea corespunzătoare martorului, ci și față de fracțiunea (*b*) a animalului tratat. În plus, așa cum am subliniat, ambele fracțiuni (*a*, *b*) prezintă o scădere a activității lor în comparație cu fracțiunile (*a*, *b*) ale mușchiului martor (fig. 1*B*, *D*, *F*).

Scăderea semnalată a fracțiunilor frontale indică instalarea unei leziuni biochimice primare sub influența DOC. Faptul că modelul izoenzimatic LDH se modifică în sensul arătat reflectă tendința de adaptare a metabolismului muscular al animalelor supuse tratamentului prelungit cu DOC, în concordanță cu necesitățile țesutului muscular, create în condițiile experimentale menționate.

Spre deosebire de DOC, cortizonul nu produce efecte evidente asupra izoenzimelor LDH, modelul izoenzimatic rămînînd, în general, similar cu cel al mușchiului animalelor netratate.

În ceea ce priveşte activitatea enzimatică totală, cei doi corticosteroizi nu exercită efecte absolut asemănătoare asupra lacticodehidrogenazei din muşchiul gastrocnemian de şobolan. Într-adevăr, determinarea activităţii enzimei în muşchiul animalelor tratate cu DOC timp de 10, respectiv 15 zile, a evidenţiat diminuarea acesteia cu 26%, respectiv 27%, faţă de lotul martor. În cazul cortizonului, s-a găsit o diminuare cu 18% a activităţii numai după 10 zile de tratament, valorile normalizîndu-se după 15 zile.

În figurile 2 şi 3 sînt prezentate spectrele electroforetice ale izoenzimelor malicodehidrogenazei (MDH) sarcoplasmatice şi ale aldolazei la animale tratate cu DOC, respectiv la animale normale. După cum rezultă din cele două figuri, aceste izoenzime se caracterizează printr-un grad de eterogenitate mult mai mic decît în cazul LDH. Într-adevăr, în muşchiul gastrocnemian de şobolan am evidenţiat două forme moleculare principale ale MDH sarcoplasmatice cu migrare anodică, dintre care una cu mobilitate electroforetică mare, iar cealaltă cu mobilitate electroforetică foarte mică. Pe lîngă acestea, în regiunea catodică se mai sesizează o bandă de intensitate slabă. Izoenzimele aldolazei din muşchiul gastrocnemian de şobolan apar sub forma unei benzi majore cu mobilitate electroforetică foarte mică şi cu tendinţa de subfracţionare în doi componenţi. După cum reiese din figura 2, se pare că sub acţiunea DOC izoenzima MDH cu mobilitatea anodică cea mai mică prezintă o scădere (10%) în raport cu fracţiunea corespunzătoare de la muşchiul martor după 10 zile de la tratament (fig. 2 *B*). În cazul izoenzimelor aldolazei (fig. 3) nu s-au evidenţiat diferenţe semnificative între spectrele electroforetice provenite din muşchiul gastrocnemian al martorilor şi cele din muşchii animalelor tratate. Nu este exclus însă ca eventualele diferenţe mai fine să fie mai greu sesizabile în aceste condiţii, tocmai din cauza eterogenităţii mai puţin accentuate a acestor izoenzime. Menţionăm, de asemenea, că spectrele electroforetice ale izoenzimelor MDH şi aldolazei nu sînt afectate în mod semnificativ la animalele tratate cu cortizon.

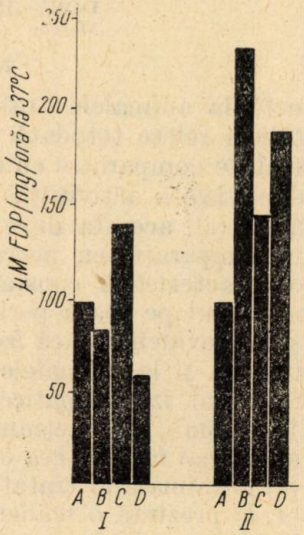


Fig. 4. — Activitatea aldolazei din muşchi.
I — Tratament DOC; II — tratament cortizon;
A — martor; *B* — 5 zile; *C* — 10 zile; *D* — 15 zile.

Variaţiile activităţii aldolazei din muşchiul gastrocnemian de şobolan normal sau tratat cu DOC, respectiv cortizon, sînt prezentate în figura 4. După cum rezultă din figură, la animalele tratate cu DOC se constată o uşoară scădere a activităţii enzimatice după 5 zile de tratament, urmată de o creştere peste valorile normale după 10 zile; în sfîrşit, după 15 zile apare o diminuare marcată a acestei activităţi. În cazul cortizonului, activitatea aldolazică este crescută peste valoarea normală în toată perioada administrării acestuia. Este de remarcat însă că această creştere a activităţii manifestă un maxim după 5 zile de tratament, urmat de o

scădere apreciabilă (10 zile) și din nou de o ușoară creștere (15 zile). Aceste date sînt în concordanță cu constatări referitoare la modificarea activității aldolazice în mușchii distrofici [19].

Din analiza rezultatelor prezentate se desprind o serie de aspecte noi, referitoare la răspunsul mușchiului striat la tratamentul prelungit, cu doze mari de corticosteroizi. În primul rînd trebuie subliniat faptul că, în conformitate cu datele existente în literatură, glucocorticosteroizii, în condițiile de administrare folosite în această lucrare, inițiază apariția unui proces miopatic în musculatura scheletică, pe cînd mineralocorticosteroizii nu exercită un asemenea efect. Ținînd seama de acest fapt, este interesant de remarcat că aspectul izoenzimatic LDH nu se modifică tocmai la mușchiul gastrocnemian de șobolan tratat cu cortizon. Se confirmă astfel ideea că alterarea spectrului izoenzimatic LDH, întîlnită în unele miopatii, nu este specifică procesului miopatic, fiind mai curînd o leziune secundară [20].

Pe de altă parte, este cunoscut faptul că în cursul procesului miopatic enzimele glicogenolizei sînt cel mai mult afectate, cele oxidative fiind relativ conservate [21]. Modificarea activității aldolazice, evidențiată de noi și semnalată și de alți autori în miopatii de alte origini, poate fi una din expresiile dereglărilor metabolice din mușchiul miopatic; ea poate fi însă pusă și pe seama intensificării proceselor catabolice, sub acțiunea glucocorticosteroizilor, net exprimată și prin scăderea în greutate a animalelor de experiență (cu aproximativ 35%). Rezultă că în acest caz nu se poate argumenta existența unui efect direct al cortizonului asupra enzimelor cercetate; el pare mai curînd să aibă o influență asupra altor evenimente metabolice, care au repercusiuni și asupra tabloului enzimatic din mușchiul striat.

În ceea ce privește DOC, se cunoaște din literatură că acesta manifestă în sisteme purificate o acțiune inhibitoare asupra unor enzime din ciclul de degradare anaerobă a glucidelor (fosforilaza a, hexokinaza) [2]. Din datele noastre reiese că DOC exercită și *in vivo* un efect net inhibitor asupra activității LDH din mușchiul striat. Mai mult, diferențele semnalate în spectrul izoenzimatic LDH, și anume inhibarea fracțiunilor rapide, sugerează și existența unei modificări calitative a enzimei sub acțiunea hormonului. În cazul aldolazei, acțiunea inhibitoare se manifestă net după un interval de 15 zile de tratament, în primele stadii ale tratamentului acest efect fiind oarecum oscilant. Spre deosebire de acțiunea cortizonului, modificarea modelului izoenzimatic ar putea fi considerată expresia unui efect direct al DOC asupra metabolismului mușchiului striat.

CONCLUZII

DOC induce în mușchiul gastrocnemian de șobolan modificări ale modelului izoenzimatic LDH interesînd tipurile de fracțiuni cu mobilitatea electroforetică cea mai mare, a căror activitate scade. El determină și o diminuare a activității LDH, precum și a aldolazei, în special după

un tratament prelungit. Cortizonul are un efect inhibitor temporar asupra activităţii LDH şi o acţiune de intensificare netă a activităţii aldolazei din muşchiul gastrocnemian de şobolan.

Institutul de biochimie al
Academiei Republicii Socialiste România

Prezentată la redacţie la 27 septembrie 1968

BIBLIOGRAFIE

1. K. Otto, Z. Vitamin-, Hormon-, Fermentforsch., **14**, 97 (1965).
2. H. Rosenkrantz, J. biol. Chem., **234**, 35 (1959).
3. C. D. Withrow, D. M. Woodbury, *Hormonal steroids. Biochemistry, Pharmacology, Therapeutics*, Academic Press, New York—Londra, 1964.
4. M. B. Lebedeva, Vopr. mediţ. himii, **2**, 278 (1956).
5. Th. M. Grewe, W. L. Williams, Anat. Rec., **130**, 145 (1958).
6. Ju. M. Pomitkin, Biul. exp. Biol. Med., **58** 40 (1964).
7. A. N. D'Agostino, M. Chiga, Ann. N. Y. Acad. Sci., **138**, 73 (1966).
8. G. Faludi, J. Gotlieb, J. Meyers, Ann. N. Y. Acad. Sci., **138**, 61 (1966).
9. M. D. Poulik, Nature, **180**, 1477 (1957).
10. H. J. Van Der Helm, Lancet, **11**, 108 (1961).
11. M. U. Tsao, Arch. Biochem. Biophys., **90**, 234 (1960).
12. M. Şerban, Rev. roum. Biochim., **4**, 211 (1967).
13. M. Şerban, D. Cotariu, Rev. roum. Biochim., **5**, 325 (1968).
14. R. Pietruszko, D. N. Baron, Biochim. biophys. Acta, **132**, 203 (1967).
15. D. Cotariu, M. Şerban, Rev. roum. Biochim., **6**, (1969).
16. H. U. Bergmeyer, *Methods of enzymatic analysis*, Verlag Chemie, Acad. Press, New York—Londra—Amsterdam, 1965, p. 736.
17. J. A. Sibley, A. L. Lehninger, J. biol. Chem., **177**, 859 (1949).
18. C. H. Fiske, J. Subbarow, J. biol. Chem., **66**, 375 (1925).
19. U. Srivastava, L. Berlinguet, Canad. J. Biochem., **42**, 1301 (1964).
20. C. M. Pearson, N. C. Kar, Ann. N. Y. Acad. Sci., **138**, 293 (1966).
21. J. C. Dreyfus F. Schapira, G. Schapira, *Progressive Muskeldystrophie, Myotonie, Myasthenie*, Springer Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1966, p. 42.

THE EFFECT OF CORTICOSTEROIDS UPON LACTIC DEHYDROGENASE, MALIC DEHYDROGENASE AND ALDOLASE ISOENZYMES IN SKELETAL MUSCLES

SUMMARY

The effect of cortisone or deoxycorticosterone (DOC) prolonged treatment was studied upon both isoenzyme pattern and activities of lactic dehydrogenase (LDH), malic dehydrogenase (MDH) and aldolase in rat skeletal muscles. It was found that DOC induces some alterations of the LDH isoenzyme pattern viz. in fractions with the highest electrophoretic mobilities which display a diminished activity. It also determines a diminution of LDH and aldolase activities, particularly after a prolonged treatment. Cortisone has a transient inhibitory effect upon LDH activity and an obvious intensification action upon aldolase activity. The significance of the above mentioned findings is discussed.

ST. CERC. BIOCHIM., 12, 1, 41—46 (1969)

METODĂ PENTRU DOZAREA FIERULUI ERITROCITAR

FLORICA ENACHE și CECIL POPPA

Rezumat. — După o trecere succintă în revistă a metodelor de dozare a Fe heminic cunoscute din literatură, autorii prezintă o metodă pe care au modificat-o și adaptat-o posibilităților laboratorului clinic. Cu această metodă și împreună cu alte determinări, ca : sideremie, hematocrit, hemoglobină ca HiCN, calcularea CHEM, au fost investigați 220 de subiecți normali (femei și bărbați). Rezultatele au dus la stabilirea valorii medii a Fe heminic la bărbați și la femei și a deviației standard, ca și la concluzia superiorității determinării Hb pe această bază față de determinarea cu oricare din metodele hemoglobinometrice uzuale. Ca atare, metoda descrisă în prezenta lucrare este deosebit de utilă celor ce pregătesc standarde de Hb, deoarece permite, pe baza determinării Fe heminic, deducerea precisă a cantității de Hb conținută în respectivul standard. Cît privește valorile Fe eritrocitar stabilite la normali, ele își găsesc utilitatea în clinica anemiilor, atît feriprive, cît și hipersideremice.

Standardizarea hemoglobinometriei a constituit între anii 1964 și 1967 o sarcină primordială a ICSH * pe plan internațional [1], [2], [3] și s-a reflectat și în preocupări similare în țara noastră [13]. Pentru rezolvarea acestei probleme, colectivul laboratorului nostru a primit sarcina de a se ocupa de punerea la punct a metodei-standard pentru dozarea hemoglobinei (ca cianhemiglobină) și de prepararea unui etalon-standard de hemoglobină, indispensabil calibrării tuturor fotometrelor cu care hemoglobina urma să se dozeze după metoda mai sus menționată [11], [12].

Pentru a cunoaște cu precizie cantitatea de Hb din etalonul preparat sau din oricare probă de sînge folosită pentru controlul metodei HiCN, am recurs la metoda dozării Fe eritrocitar (respectiv heminic) [4], [7], de unde am dedus corespondentul său în Hb. Aceasta este singura metodă care, dozînd chimic conținutul de Fe heminic al hematiei, permite să se afle prin calcul întregul conținut hemoglobinic al acesteia. Ea pune în evidență, așadar, toate formele de Hb existente în eritrocit, ceea ce nu se poate realiza cu nici una din metodele colorimetrice de hemoglobinometrie. Deși este cea mai precisă metodă, ea nu este descrisă în cărțile de specialitate [4]. Recent, Sunderman (citat după [5]) subliniază folosirea ei ca metodă-standard de referință, datorită preciziei și reproductibilității rezultatelor sale, ca și posibilității de a fi aplicată în cele mai multe laboratoare clinice [5].

ICSH = International Comitee for Standardization in Hematology.

Metodele pentru dozarea Fe eritrocitar pornesc de la acelaşi principiu general, şi anume acela al separării lui, prin distrugerea substratelor organice de care se află legat, şi extragerea lui cu ajutorul unui reactiv adecvat. Deosebirea începe de la modalitatea de distrugere a substanţelor organice : uscată sau umedă.

Metodele din prima categorie implică distrugerea unei cantităţi cunoscute de sînge, prin combustie, într-un cuptor acoperit, pînă la cenuşă ; Fe este extras apoi din cenuşă sub formă de clorură feroasă şi determinat prin titrare [4]. O metodă bine cunoscută, bazată pe acest principiu, este cea descrisă de King şi Wooton în 1956 (citat după [14]). S-a constatat însă că aceste metode prezintă unele inconveniente. Monier şi Williams (citaţi după [14]) au arătat că se poate pierde Fe prin volatilizare, mai ales dacă clorurile nu sînt îndepărtate înainte de incinerare; Tompsett (citat după [14]) a obţinut într-adevăr o slabă recuperare a Fe, folosind pentru combustie vase de siliciu, deşi a căutat să împiedice pe cît cu putinţă pierderile. Jackson (citat după [14]) afirmă că distrugerea pe cale umedă este mai satisfăcătoare decît cea pe cale uscată.

Metodele din a doua categorie recurg la separarea Fe din complexul porfirinic al moleculei de Hb prin tratare cu un acid, convertirea lui din feros în feric cu un agent oxidant şi, în fine, evaluarea lui colorimetrică. Mai mulţi autori (Berman, Brown, Wong) (citaţi după [4], [14]) au publicat astfel de metode, bazate pe acelaşi principiu, dar diferind prin acidul folosit pentru separare (sulfuric sau percloric) şi prin agentul de oxidare folosit pentru convertirea Fe în formă ferică. Alţi autori (Combs, Jenkins, Thomson) (citaţi după [14]) au întîmpinat greutăţi la obţinerea de rezultate reproductibile cu metoda Wong, în primul rînd datorită pălirii rapide a culorii complexului de tiocianat feric şi, în al doilea rînd, din cauza turbidităţii ce apare în această soluţie. Mai mulţi autori (Kennedy, Delory, Thorpe, Watson, Häberli) (citaţi după [14]) au căutat să înlăture aceste neajunsuri cu ajutorul altor reactivi. Metodele menţionate pun însă cîteva probleme, printre care : lipsa de certitudine asupra eliberării întregii cantităţi de Fe, pălirea rapidă a culorii, pătrunderea vreunui strop de apă în lichidul colorat, care ar produce turbiditate etc. [14].

Cele arătate mai sus indicau necesitatea unei metode sigure şi rapide pentru determinarea Fe eritrocitar, care să nu sufere de neajunsurile sus-citate.

În laboratorul nostru am încercat o serie de metode, oprindu-ne la aceea a lui Fine [4], pe care am adaptat-o însă posibilităţilor noastre, realizînd astfel un procedeu foarte convenabil atît din punctul de vedere al naturii reactivilor folosiţi, cît şi din acela al reproductibilităţii rezultatelor ; îl prezentăm în cele ce urmează.

METODA

Reactivi

1) Acid sulfuric concentrat p.a. ;

2) clorat de potasiu ($KClO_3$) soluţie saturată ; se prepară prin dizolvarea a 10 g substanţă în 100 ml apă distilată la cald ; se răceşte şi se filtrează ;

3) tiocianat de potasiu 3N;
4) wolframat de sodiu 10 g/100 ml;
5) soluție standard de Fe; se prepară astfel: 0,7 g sulfat dublu de fier și amoniu $[(NH_4)_2SO_4.FeSO_4]$ se dizolvă în 10 ml apă distilată, se adaugă 5 ml reactiv 1, se încălzește ușor amestecul și se titrează cu permanganat de potasiu 0,1 N pînă ce oxidarea Fe este completă; soluția se aduce la 1000 ml cu apă distilată; ea conține 0,1 mg Fe/ml.

TEHNICA DETERMINĂRII

Într-o eprubetă gradată de centrifugă, care conține 0,5 ml apă distilată, se adaugă următoarele: 0,025 ml sînge integral, recoltat din pulpa degetului, 0,1 ml reactiv 2, 0,1 ml reactiv 1.

Se amestecă prin scuturare și se ține eprubeta într-o baie de apă la fierbere, timp de 10 min. Se răcește, se adaugă 0,1 ml reactiv 4, se amestecă și se aduce la 2,5 ml cu apă distilată, se amestecă din nou și se lasă în repaus 2 min; precipitatul alb format se îndepărtează printr-o centrifugare la 6000 t/m timp de 15 min. Peste 2 ml din supernatant se adaugă 5 ml din reactivul 3; spontan se dezvoltă o culoare roz-ruginie, a cărei intensitate este proporțională cu concentrația în Fe. Culoarea fiind fugace și pălind repede, îndată după adăugarea reactivului 3 (60 s.) extincția trebuie citită la fotometru, în cuve de 1 cm, cu filtrul S 53, contra H_2O distilată. În paralel cu proba se lucrează și standardul astfel: se pipetează 0,1 ml standard într-o eprubetă în care se află 1,75 ml apă distilată, se adaugă 0,15 ml reactiv 2, apoi 0,5 ml reactiv 3; ca și în proba de cercetat, îndată după adăugarea reactivului 3 apare culoarea, iar extincția se citește la fotometru exact în aceleași condiții ca mai sus.

Orice întîrziere între adăugarea reactivului 3 și citirea extincțiilor, trebuie evitată, deoarece ar da valori din ce în ce mai scăzute. Practic, acest deziderat se poate realiza efectuînd în toate probele de experiență toate operațiile, pînă la adăugarea ultimului reactiv. Acesta se pune la fiecare probă în parte, care apoi este trecută imediat în cuvă și citită la fotometru. În acest fel se evită principalul factor de eroare al metodelor similare din literatură.

Calcul

$$\text{Fe (mg/100 ml)} = \frac{\text{ext. probă}}{\text{ext. std.}} (0{,}01 \times 4000 \times 1{,}25) = \frac{\text{ext. probă}}{\text{ext. std.}} 50,$$

unde 0,01 = mg Fe din 0,1ml soluție standard; 4000 = coeficientul de multiplicare pentru trecerea de la volumul de 0,025 ml sînge recoltat la volumul de 100 ml, la care se raportează rezultatul; 1,25 = coeficientul ce exprimă raportul de utilizare al probei aduse la volumul de 2,5 ml din care s-au luat pentru determinare numai 2 ml.

Din valoarea Fe heminic putem calcula valoarea Hb din respectiva probă de sînge astfel:

$$\text{Fe (mg/100 ml)}\ 0{,}288 = \text{Hb (g/100 ml)}.$$

Ecuaţia este dedusă dintr-o serie de calcule care îşi au punctul de plecare într-o relaţie stabilită de ICSH cu privire la conţinutul în Fe al moleculei de Hb. Dacă 1 g Hb conţine 3,47 mg Fe, atunci 1 mg Fe este conţinut în 1/3,47 g Hb (0,288).

REZULTATE

Am studiat o serie de subiecţi sănătoşi, femei şi bărbaţi, cu următoarele determinări : sideremie [9], hematocrit [8], Hb ca HiCN [12], calculul valorii CHEM * [6], [15], Fe heminic, calculul Hb pe baza Fe heminic [1], [2], calculul CHEM pe baza celei de-a doua valori a Hb.

Tabela 1

Valorile medii ale rezultatelor obţinute pe 220 de subiecţi normali

Nr. de cazuri	Sideremie (μg/100 ml)	Ht %	Fe eritro (mg/100 ml)	Hb din val. Fe eritro (g/100 ml)	Hb ca HiCN (g/100 ml)	CHEM %	
						Hb—Fe	Hb—HiCH
110	119 (100—130)	45 (41—50)	53 (45,1—59)	15,2 (13—17)	15 (13—17)	33,7 (31,7—35)	33,3
110	97 (90—110)	41 (37—44)	45 (38,2—50,3)	13 (11—14,5)	12,8 (11—14,5)	31,7 (29,7—34)	31,2

Tabela 2

Valorile Hb obţinute prin dozare directă şi prin determinarea Fe eritrocitar

Proba	Fe eritro (mg/100 ml)	Hb (Fe eritro) (g/100 ml)	Hb (HiCN) (g/100 ml)
1	53,90	15,52	15,25
2	54,65	15,74	15,65
3	52,73	15,18	14,90
4	52,73	15,18	14,98
5	54,29	15,63	15,55
6	54,65	15,74	15,55
7	53,90	15,52	15,30
8	53,12	15,30	15,10
9	53,90	15,52	15,19
10	54,65	15,74	15,58
M(mg/100)	53,85	15,50	15,30
σ (,, ,.)	±0,75	±0,22	±0,26
CV (%)	±1,40	±1,41	±1,74

Din rezultatele obţinute am triat ca normale 220 de cazuri, adică acelea care aveau toate constantele de mai sus cuprinse între limitele normale ; la toţi subiecţii am găsit Hb obţinută prin metoda HiCN apro-

* CHEM = conc. Hb/eritrocitare medii $= \frac{\text{Hb(g/100 ml)}}{\text{Ht\%}} 100$, unde Ht = hematocritul.

piată sau chiar superpozabilă valorii Hb obținute pe baza dozării Fe heminic. Faptul acesta dovedește că determinările de Fe eritrocitar au fost efectuate cu o bună precizie. Cifrele lor ne arată că în populația noastră normalul se situează : la bărbat la nivelul de 53 $\pm$ 7 mg Fe/100 ml, iar la femeie la 45 $\pm$ 6 mg Fe/100 ml. De altfel, în tabela 1 sînt prezentate toate valorile medii ale studiului efectuat pe cei 220 de subiecți normali.

În privința reproductibilității, metoda ne-a dat rezultate foarte bune. Pentru evidențierea acestui fapt am lucrat aceeași probă de sînge de 10 ori, efectuînd : dozarea Fe eritrocitar, calcularea Hb pe baza valorii Fe, determinarea Hb ca HiCN. Rezultatele sînt prezentate în tabela 2, care arată că valorile σ și CV sînt mai mici la determinarea Hb pe bază de Fe eritrocitar decît la determinarea Hb ca HiCN.

CONCLUZII

O metodă pentru determinarea Fe din eritrocit este foarte utilă atît pentru investigarea generală a fierului din compartimentul circulator, cît și în anumite cazuri de anemii însoțite de hipersideremie [10].

Metoda descrisă în prezenta lucrare este simplă, rapidă și practică, pentru că folosește o cantitate foarte mică de sînge. Reactivii folosiți sînt mai stabili decît cei utilizați în alte metode. Respectînd mențiunea, special făcută în descrierea metodei, privitor la evitarea inconvenientului pe care-l prezintă binecunoscuta decolorare rapidă a amestecului în care se determină Fe heminic, se pot obține rezultate corecte și reproductibile.

Prezentată la redacție la 10 iulie 1968

Institutul de hematologie,
București

BIBLIOGRAFIE

1. Borovicheny Ch. G., *Erythrocytometric methods and their standardization*, Bibliotheca Haemat., S. Karger, Basel, 1964, vol. 18.
2. Borovicheny Ch. G., *Standardization, documentation and normal values in haematology*, Bibliotheca Haemat., S. Karger, Basel, 1965, vol. 21.
3. Borovicheny Ch. G., *Standardization in Haematology*, Bibliotheca Haemat., S. Karger, Basel, 1966, vol. 24.
4. Fine J., J. clin. Path., **XIV**, 561 (1961).
5. Fischl J., Clin. chim. Acta, **4**, 686 (1959).
6. Nicolau C. T., Nicoară S. T., *Progrese în tehnicile hematologice uzuale*, Edit. medicală, București, 1966.
7. van Oudheusden A. P. M., van de Heuvel J. M., van Stekelenburg G. J., Siertsema L. H., Wadman S. K., Ned. T. Geneesk., **6**, 265 (1964).
8. Poppa C., Tonea T., Docum. hematol., **3**, 125 (1960).
9. Poppa C., Enache Fl., St. cerc. biochim., **2**, 407 (1959).
10. Poppa C., Docum. hematol., **4**, 183 (1960).
11. Poppa C., Enache Fl., Nicoară S. T., St. cerc. med. int., **6**, 133 (1965).
12. Poppa C., Enache Fl., Docum. hematol., **1**, 247 (1966).
13. Poppa C., Nicoară S. T., Enache Fl., Med. int., **20**, 65 (1968).
14. Street H. V., J. Forensic Medicine, **8**, 47 (1961).
15. Wintrobe M. M., *Clinical Haematology*, Lea and Febiger, Philadelphia, 1962.

ASSAY OF IRON IN ERYTHROCYTES

SUMMARY

After a brief survey of the methods for assaying heme iron, the authors present a modified procedure, adapted to the possibilities of clinical laboratories.

By means of this method and along with other determinations (plasma iron assay, hematocrit, Hb determination as HiCN, and CHEM calculation) 220 normal individuals (men and women) have been investigated.

In this way, the mean values of the Hb-iron and their standard deviation were established; the conclusion was also reached that this procedure is superior to any other common assay methods of hemoglobinometry.

Consequently, the method appears very useful to those who prepare Hb standards, because it allows — on the basis of Hb-iron assay — a precise determination of the Hb content in the standard, to be performed.

As far as normal mean values of heme iron are concerned, they are useful in clinical studies of anemias, either with iron deficiency or with plasma-iron overloading.

ST. CERC. BIOCHIM., 12, 1, 47—52 (1969)

ACTIVITATEA OXIDAZELOR ÎN CIREŞE ÎN TIMPUL CREŞTERII ŞI MATURĂRII LOR

ELENA ILIESCU-MORUJU

Rezumat. — Urmărindu-se stabilirea de noi criterii biochimice pentru desemnarea momentului de maturitate deplină a fructelor, corespunzător recoltării lor, s-a determinat activitatea oxidazelor la pH acid (4,7) şi neutru (7,0) în timpul creşterii şi maturării cireşelor. Activitatea peroxidazei nu s-a manifestat de loc, iar a ascorbinoxidazei numai pînă la începutul lignificării endocarpului.
S-a stabilit că momentului de maturare deplină îi corespunde o creştere bruscă a raportului dintre activitatea polifenoloxidazei la pH 4,7 şi activitatea la pH 7,0, datorită creşterii ei la primul pH şi scăderii la cel de-al doilea. Scăderea ulterioară a acestui raport corespunde stării de supramaturare.

Calitatea fructelor în perioada de consum este în funcţie de gradul de maturare la care s-a făcut recoltarea şi la care ele se consumă, apreciat, în general, după coloraţia fructelor, fermitatea şi caracterele organoleptice ale pulpei. Cum însă gradul de maturare corespunzător momentului optim de recoltare este determinat, în ultimă instanţă, de starea fizico-chimică a ţesuturilor fructelor, analiza chimică constituie criteriul riguros obiectiv pentru caracterizarea lui. În acest sens s-au întreprins numeroase studii asupra procesului de maturare la diferite fructe, stabilindu-se existenţa anumitor corelaţii cantitative între componentele chimice ale fructului la maturitatea de consum. Astfel, la mere [4], [5], [6], [17], [25], prune [18], [22], piersici [3], [23], cireşe şi vişine [9], [19], struguri [14], [15] s-a urmărit evoluţia cantitativă a principalelor componente chimice : apă, zahăr, acizi organici, taninuri, substanţe minerale, substanţe pectice, vitamină C şi s-au stabilit unele corelaţii între acestea [16]. De asemenea, analize calitative asupra prezenţei particulelor active citoplasmatice la pere [1] şi caise [2], a compuşilor polifenolici la piersici [3], a aminoacizilor liberi în tomate [8], a proteinelor „solubile" în sucuri [13], a activităţii unor enzime în diferite fructe [12], a substanţelor oxidabile cu bicromat de potasiu [24], precum şi unele proprietăţi fizice ale pulpei fructelor [20], [21] au arătat schimbări ce converg spre indicarea unei anumite stări fizico-chimice corespunzătoare momentului maturităţii depline a fructului.

Pe linia cercetărilor amintite, în lucrarea de faţă s-a studiat activitatea ascorbinoxidazei, polifenoloxidazei şi peroxidazei în cireşe de-a lungul perioadei de creştere şi maturare, urmărindu-se stabilirea unui indice biochimic al momentului de maturitate deplină a fructelor, cînd acestea trebuie să fie recoltate.

MATERIAL ŞI METODE

Studiul a fost întreprins în anii 1963 şi 1964 la Institutul de cercetări hortiviticole Bucureşti-Băneasa, lucrîndu-se cu cireşe din soiurile Ramon Oliva, Germersdorf (soiuri nobile) şi Amar (sălbatic), de la scuturarea florilor pînă la faza de supracoacere. Fructele au fost recoltate din cele patru puncte cardinale ale coroanei, la înălţimea de 1,5—2,0 m (poalele coroanei). Probele de analiză au fost alcătuite din cîte 40 de fructe.

Activitatea polifenoloxidazei s-a determinat iodometric, prin metoda Mihlin şi Bronoviţkaia [7], în suspensii 1 :20 în tampon acetat-acid acetic (pH 4,7) şi în apă cu $CaCO_3$ (pH 7,0). Rezultatele s-au exprimat în mg acid ascorbic oxidat în 2 min de către 1g material proaspăt.

În aceleaşi extrase, tot iodometric, s-a urmărit şi activitatea peroxidazei şi a ascorbinoxidazei, dar prima enzimă nu şi-a manifestat activitatea de loc, iar a doua numai pînă la începutul lignificării sîmburelui (la pH 4,7).

REZULTATE

Mersul activităţii polifenoloxidazei, prezentat în tabelele 1 şi 2, este asemănător la cele trei soiuri, dar asemănarea este mai mare între soiurile valoroase Ramon Oliva şi Germersdorf. La toate soiurile, activitatea enzimei a fost mai mare în anul 1963 decît în 1964, datorită, probabil, condiţiilor climatice diferite.

La pH acid (4,7), imediat după fecundare (I), activitatea oxidazică este mare. Ea scade treptat pînă în momentul individualizării sîmburelui (II), cînd începe procesul de lignificare a endocarpului. Mai departe, în tot timpul acestui proces, activitatea polifenoloxidazei în mezocarp creşte. O dată cu virarea culorii fructului de la verde la galben, în succesiunea fazelor premergătoare maturării (III—IV), activitatea enzimei scade din nou, la început mai rapid, apoi mai lent. În momentul maturităţii depline, cînd coloraţia caracteristică soiului are maximul de intensitate şi cînd se face şi recoltarea (V), activitatea creşte brusc. După trecerea acestui moment, cînd fructul are culoarea roşie-brună închis şi este supracopt (faza de postmaturare VI), activitatea enzimei scade din nou.

La pH neutru (7,0), activitatea polifenoloxidazei este mai mică decît la pH acid ; diferenţa este mai mică la soiurile valoroase, dar foarte mare la cireşul sălbatic. Curba activităţii enzimei la acest pH este aproximativ paralelă cu cea de la pH 4,7 de-a lungul fazelor de creştere şi maturare. În momentul maturităţii depline şi la postmaturare apar însă diferenţe sensibile : în timp ce la pH acid în momentul maturităţii activitatea creşte, la pH neutru ea continuă să scadă, la cireşul sălbatic atingînd o valoare practic egală cu zero ; în starea de supramaturare, activitatea la pH acid scade din nou, pe cînd la pH neutru creşte la soiurile nobile şi dispare la cireşul sălbatic.

Tabela 1

Activitatea polifenoloxidazei în cireşe (anul 1963)

Ramon Oliva					Germersdorf					Amar sălbatic				
Data	pH		4,7/7,0	Etapa	Data	pH		4,7/7,0	Etapa	Data	pH		4,7/7,0	Etapa
	4,7	7,0				4,7	7,0				4,7	7,0		
4.IV	75,18	—	—		5.IV	86,56	—	—	I	6.IV	118,34	—	—	I
8.IV	50,47	31,02	1,62	I	10.IV	99,31	70,20	1,41		13.IV	74,92	8,32	9,00	
14.IV	24,00	12,00	2,00		18.IV	58,35	58,35	1,00		22.IV	68,27	16,06	4,25	II
22.IV	28,11	16,03	1,75		28.IV	50,40	11,71	4,30	II	3.V	106,93	19,92	13,50	III
4.V	31,62	19,76	1,59	II	5.V	64,91	16,23	4,00		31.V	39,57	7,92	4,99	IV
15.V	8,00	5,06	1,57	III	19.V	12,00	4,00	3,00	III	9.VI	12,16	4,05	3,00	IV
19.V	10,60	3,00	3,33	IV	1.VI	8,15	4,07	2,00	IV	12.VI	18,20	1,10	16,55	V
22.V	7,50	4,00	1,78	V	9.VI	10,05	3,05	3,29	V	15.VI	10,25	0,00	∞	VI
				VI	12.VI	5,12	4,00	1,28	VI					

Etape: I — imediat după fecundare; II — individualizarea sîmburelui, desprinderea pulpei de sîmbure; III — sîmburele lignificat complet, culoarea fructului verde-galbenă; IV — fructul trece de la galben la roz; V — maturitatea de recoltare, pigmentaţie caracteristică; VI — supramaturitate.

Tabela 2

Activitatea polifenoloxidazei în cireşe (anul 1964)

Ramon Oliva					Germersdorf					Amar sălbatic				
Data	pH		4,7/7,0	Etapa	Data	pH		4,7/7,0	Etapa	Data	pH		4,7/7,0	Etapa
	4,7	7,0				4,7	7,0				4,7	7,0		
1.V	35,00	19,92	1,75	I	4.V	38,60	15,70	2,46	I	5.V	67,22	8,54	7,86	I
5.V	9,22	6,89	1,34		10.V	10,02	7,42	1,34	II	20.V	45,76	7,80	5,87	
10.V	14,75	12,26	1,20	II	25.V	14,49	7,24	2,00	III	26.V	31,08	5,68	3,00	II
20.V	10,80	9,14	1,17	III	1.VI	10,46	6,63	1,58		1.VI	36,31	6,90	5,26	
26.V	7,88	5,82	1,35	IV	9.VI	7,81	5,00	1,56	IV	11.VI	38,22	7,56	5,05	III
30.V	10,13	2,44	4,15	V	12.VI	9,40	1,68	5,59	V	19.VI	18,48	2,62	7,05	
1.VI	6,44	2,41	2,67	VI	15.VI	7,56	2,52	3,00	VI	25.VI	14,53	0,10	145,30	IV
										28.VI	25,80	0,00	∞	V
										30.VI	13,80	0,00	∞	VI

Etape: I — imediat după fecundare; II — individualizarea sîmburelui, desprinderea pulpei de sîmbure; III — sîmburele lignificat complet, culoarea fructului verde-galbenă; IV — fructul trece de la galben la roz; V — maturitatea de recoltare, pigmentaţie carateristică; VI — supramaturitate.

DISCUȚII

În țesutul fructului de cireș, oxidările metabolice aerobe par să aibă loc, caracteristic, cu ajutorul oxigenului liber gazos aflat în țesut. În acest fel lucrează ascorbinoxidaza, prin intermediul acidului ascorbic, pînă la începutul procesului de lignificare a endocarpului, iar polifenoloxidaza, prin intermediul polifenolilor, de-a lungul fazelor de dezvoltare a fructului (nu avem indicații proprii sau din literatură asupra citocromoxidazei din fructe). După cum reiese din încercările noastre, peroxidaza, care acționează tot prin intermediul polifenolilor, dar cu ajutorul oxigenului scos din peroxizi, nu se manifestă de loc, în nici o fază de dezvoltare a fructului.

Activitatea ridicată a polifenoloxidazei în fruct, imediat după fecundarea ovarului, reflectă înaltul potențial metabolic al țesuturilor ce se formează în urma diviziunii intense a zigotului și care reclamă multă energie eliberată oxidativ. De la fecundare pînă la individualizarea sîmburelui, activitatea enzimei scade treptat, dar o dată cu începutul procesului de lignificare a endocarpului ea crește continuu, pînă la lignificarea completă a acestuia, încetarea creșterii fructului pe seama diviziunilor celulare și virarea culorii verzi a clorofilei în galben (faza de prepîrgă). Cum în unele lucrări [11] se preconizează un rol uneori important al polifenoloxidazei, alături de peroxidază, în procesul de sinteză a ligninei din acidul coniferilic, este de presupus ca în cazul nostru, mai ales în lipsa activității peroxidazei, creșterea activității polifenoloxidazei o dată cu începutul procesului de lignificare a endocarpului să se explice prin acest rol.

Virarea culorii fructului de la verde la galben corespunde așa-numitului „punct climacteric" [24] și marchează începutul perioadei de maturare a fructului. Acest moment se caracterizează, printre altele, printr-o criză respiratorie, anume prin scăderea continuă a respirației, după o scurtă creștere anterioară. Activitatea polifenoloxidazei începe să scadă și ea. O dată cu începutul fazei de maturare a fructului se schimbă compoziția atmosferei interne a țesuturilor lui, datorită schimbării proprietăților de difuzie a gazelor : în fructul în curs de maturare scade cantitatea de oxigen, explicîndu-se astfel scăderea intensității oxidărilor aerobe, cu toată abundența de substanțe oxidabile (zaharuri). Și scăderea activității polifenoloxidazei s-ar putea corela cu această lipsă a oxigenului liber.

Activitatea enzimei s-a determinat la două pH-uri, acid și neutru, pentru a se urmări nu numai schimbările cu caracter cantitativ, ci și pe cele cu caracter calitativ, evidențiate printr-o cerință a unor alte condiții optime pentru activitatea enzimei *in vitro*. Dacă de la fecundarea ovarului și pînă la faza de maturare, cînd fructul se recoltează, activitatea enzimei la cele două pH-uri s-a manifestat similar, în momentul maturității fructului apare o deosebire netă la toate soiurile, activitatea crește la pH acid, iar la pH neutru continuă să scadă, astfel încît raportul dintre aceste activități crește sensibil (la cireșul sălbatic acest raport tinde spre infinit, numitorul tinzînd către zero). În starea de supracoacere a fructului, activitatea la pH acid scade din nou, iar cea la pH neutru crește ușor la soiurile valoroase sau dispare la cireșul sălbatic. Deosebirea se datorește, probabil, reacției diferite a enzimei la condițiile artificiale ale mediului

în care este pusă să lucreze *in vitro*, reacţie datorată anumitor schimbări ale stării fizico-chimice ale apoenzimei, care-i conferă anumite proprietăţi de afinitate faţă de substrat. Poate să fie vorba de izoenzime. Schimbările acestea arată un punct culminant în dezvoltarea fructului, care corespunde stării de maturitate deplină a lui, optimă pentru consum.

CONCLUZII

1. Dintre oxidazele cercetate, în fructele de cireş se manifestă activitatea ascorbinoxidazei, pînă la începutul procesului de lignificare a endocarpului, şi a polifenoloxidazei, în tot timpul creşterii şi maturării fructului. Peroxidaza nu se manifestă de loc.

2. Polifenoloxidaza este mai activă la pH acid (4,7) decît la pH neutru (7,0), iar activitatea ei este mult mai mare la cireşul sălbatic (Amar) decît la soiurile valoroase Ramon Oliva şi Germersdorf.

3. Faza de maturitate deplină a fructului (corespunzătoare momentului de recoltare) este marcată de creşterea activităţii enzimei la pH acid şi scăderea ei la pH neutru, ceea ce se observă pregnant prin creşterea sensibilă a raportului activităţilor la cele două pH-uri. Fructul supracopt prezintă situaţia inversă.

4. La cireşul sălbatic, în momentul maturităţii depline, activitatea polifenoloxidazei la pH neutru dispare ireversibil.

Prezentată la redacţie la 8 aprilie 1968

Institutul central de cercetări agricole, Staţiunea experimentală pomicolă Voineşti-Dîmboviţa

BIBLIOGRAFIE

1. Bain J. M., Mercer F. V., Austr. J. exp. Biol. med., Sci., **17**, 78 (1964).
2. Catlin P. B., Plant Physiol., **35**, 1960 (supl. XIII).
3. Creft C. C., Proc. amer. Soc. hort. Sci., **78**, 119 (1961).
4. Davignon L., Thèse Doct. Univ. Paris, 1959.
5. Dzamić M. D., Recueil Trav. Rech. Fac. agron., Belgrade, **41**, 103 (1956).
6. Dzamić M. D., Recueil Trav. Rech. Fac. agron., Belgrade, **41**, 97 (1956).
7. Ermakov A. I. ş.a., *Metodî biohimiceskogo issledovaniia rastenii*, Gosud. izd. selkohoz. lit., Moscova, 1952.
8. Freeman J. A., Woodbridge C. G., Proc. amer. Soc. hort. Sci., **76**, 515 (1960).
9. Gherghi A., Com. Acad. R.P.R., **VI**, 2 (1956).
10. Goldstein J. L., Swain T., Phytochemistry, **2**, 371 (1963).
11. Higuchi T. ş.a., J. Japanese forest. Soc., **37**, 446 (1955).
12. Ireland J. P., Dec. Fruit Gr., **11**, 120 (1961).
13. Koch J. ş.a., Z. Lebensmitt. Untersuch., **109**, 395 (1959).
14. Lamazou-Betheden M., Pech R., Ann. tech. agric., Ser. E, **6**, 293 (1957).
15. Marteau G., C. R. Acad. Agric. France, **41**, 193 (1955).
16. Radu I. F. ş.a., Bul. şt. Secţia biol. şi şt. agric., seria agron., Acad. R.P.R., **IX**, 1957.
17. Radu I. F., ş.a., Lucr. şt. I.C.H.V. 1958—1959, 499.
18. Radu I. F. ş.a., Lucr. şt. I.C.H.V. 1959—1960, 115.
19. Radu I. F., Gherghi A., Lucr. şt. I.C.H.V. 1959—1960, 129.
20. Rasmussen P. M., Tidsskr. Planteavl., **66** 353 (1962).
21. Romani R. J., Calif. Agric., **15**, 3 (1961).
22. Sapojnikova E. V., Biohim. Plod. ovoşc., **4**, 88 (1958).
23. Sterling C., Kalb A. J., Bot. Gaz., **121**, 111 (1959).
24. Ulrich R., *La vie des fruits*, Ed. p II Paris, 1952.
25. Woodmensee C. W. ş.a., Food. Res., **24**, 503 (1959).

THE ACTIVITY OF OXIDASES IN SWEET CHERRIES DURING GROWTH AND MATURATION

SUMMARY

In order to find new biochemical criteria to characterize the moment of complete maturation of the fruits, in relation to their harvesting the activity of oxidases at pH 4,7 and 70, has been determined, during the growth and maturation of sweet cherries. There is no peroxidase activity and that of ascorbic oxidase has been observed only until the beginning of endocarp lignification.

At the moment of complete maturation there occurs a sharp increase in the ratio of polyphenoloxidase activity at pH 4.7 and 7.0, at the first pH this activity being high and at the second lower. The subsequent lowering of this ratio corresponds to the supermaturation state.

ST. CERC. BIOCHIM., 12, 1, 53—57 (1969)

CARACTERIZAREA IMUNOELECTROFORETICĂ A γ-GLOBULINELOR DIN SERUL SANGUIN ŞI LAPTELE COLOSTRAL BOVIN, IZOLATE PRIN FILTRARE PE GEL DE DEXTRAN *

VALERIU V. MICUŞAN

Rezumat. — Filtrarea prin gel de dextran a unor precipitate globulinice obţinute din serul sanguin şi din zerul de lapte colostral bovin permite izolarea unor tipuri de γ— globuline care se repartizează în două piscuri de filtrare. Astfel, în precipitatul globulinic sanguin se evidenţiază, în primul pisc, globulina IgM, iar în piscul al doilea globulina IgG, alături de alte proteine serice. Filtrarea precipitatului globulinic colostral arată prezenţa, în primul pisc, a unui tip de globulină avînd proprietăţi imunochimice asemănătoare cu ale globulinei IgG. Piscul al doilea conţine globulina IgG impurificată cu urme din globulina eluată în primul pisc. Se discută comportarea imunochimică a globulinei colostrale din primul pisc al filtrării pe Sephadex G-200.

Laptele colostral bovin conţine, în funcţie de rasa animalului, 14 — 16 g proteine la 100 ml de secreţie, din care imunoglobulinele reprezintă peste 70% [1], [2]. Aceste proteine au un rol important în transmiterea stării de imunitate la animalele cu placentă de tip sindesmocorial, iar originea lor se găseşte în sîngele animalului matern. Din circuitul sanguin, printr-un proces fizico-chimic încă nu destul de bine cunoscut, ele ajung să se acumuleze în glanda mamară *ante partum* [3], [4]. Această acumulare a imunoglobulinelor din sînge în glanda mamară se realizează concomitent cu o selecţie, şi anume în laptele colostral sînt prezente aproape numai imunoglobuline cu mobilitate electroforetică mai mare decît a celor din sînge [5], [6], [7]. Fenomenul de selecţie şi acumulare se realizează cu păstrarea relaţiilor de antigeniticitate între imunoglobulinele serice şi cele din laptele colostral [8], [9].

Deoarece spectrul electroforetic al imunoglobulinelor din sînge este foarte diferit de al celor din laptele colostral, ne-am propus să cercetăm eventuala fracţionare pe clase a acestor imunoglobuline, utilizînd gelul de dextran de tip Sephadex G-200.

---

* Lucrare prezentată la Simpozionul de imunoelectroforeză, Bucureşti, 9.XII. 1967.

MATERIAL ȘI METODE

Sîngele și laptele colostral s-au recoltat de la vaci de rasă Brună. Imunoglobulinele s-au obținut prin precipitarea cu $(NH_4)_2SO_4$ 33% a serului sanguin și a zerului de lapte colostral, acesta din urmă obținut după precipitarea cazeinei cu HCl 0,2N. Precipitatele globulinice s-au reluat la volumul inițial și s-au dializat față de soluția tampon 0,1 M TRIS-HCl în 0,2 M NaCl, la pH 8,0. Filtrarea prin gel s-a făcut folosindu-se coloane de 2,5/100 cm, materialul de tip Sephadex G-200 prelucrîndu-se după metodele obișnuite [10]. Filtrarea proteinelor s-a făcut cu soluție tampon 0,1M TRIS-HCl în 0,2 M NaCl, la pH 8,0, recoltîndu-se fracțiuni de cîte 10 ml. Citirile s-au făcut la 280 mμ cu spectrofotometrul VSU 1, Zeiss-Jena. Electroforeza, imunoelectroforeza și dubla difuzie în gel de agar s-au efectuat după tehnicile uzuale [10]. Antiserurile s-au obținut după imunizarea iepurilor cu ser de vacă sau lapte colostral, folosindu-se adjuvant Freund complet.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Filtrarea a 10 ml din precipitatul globulinic sanguin, aplicat în coloana Sephadex G-200 într-o concentrație proteinică corespunzătoare γ — globulinelor din sînge (2,43 g%), a dus la obținerea a trei piscuri de filtrare, de formă inegală (fig. 1). Primul pisc reprezintă proteinele ce părăsesc coloana o dată cu volumul liber al acesteia și reprezintă 12,5% din suprafața totală de filtrare; piscul al doilea, mult mai mare, ocupă 77,5%, iar al treilea numai 10%

Analiza electroforetică pe gel de agar, după concentrarea filtratelor la volumul inițial introdus în coloană, arată că în primul pisc sînt prezente α_2 — macroglobulina, precum și un spot mai puțin vizibil în regiunea catodică (fig. 2 *b*). Din imaginea electroforetică a piscului al doilea al filtrării precipitatului globulinic sanguin rezultă că în acest pisc sînt prezente aproape toate fracțiunile proteice componente ale serului sanguin, inclusiv albumina, dominantă rămînînd însă fracțiunea globulinică (fig. 2 *c*). Al treilea pisc este alcătuit din albumina care impurifică precipitatul globulinic.

Analiza imunoelectroforetică a celor două piscuri principale, obținute după filtrarea prin gel a precipitatului globulinic sanguin, arată că în primul pisc este bine reprezentată α_2 — macroglobulina; se observă de asemenea și prezența liniei de precipitare caracteristice pentru globulina IgM (fig. 3 *b*). În piscul al doilea apar bine reliefate arcurile de precipitare ale globulinei IgG, transferinei, ceruloplasminei, β_1 A — globulinei și poate fi identificată și o linie mai slabă pentru globulina IgA. Ca și în cazul analizei electroforetice, se observă bine conturate liniile de precipitare ale albuminei (fig. 3 *c*).

Filtrarea pe gel de Sephadex G-200 a precipitatului globulinic de zer colostral arată prezența a două piscuri. Primul reprezintă 43%, iar al doilea 57% din suprafața totală de filtrare. Analiza electroforetică a primului pisc arată prezența unui tip de γ — globulină cu mare mobili-

tate (fig. 2 *f*) şi care la imunoelectroforeză prezintă două arcuri de precipitare, unul mai intens şi cu mobilitate mare, al doilea slab ca intensitate şi cu mobilitate mai mică (fig. 3 *f*). Piscul al doilea se prezintă sub forma

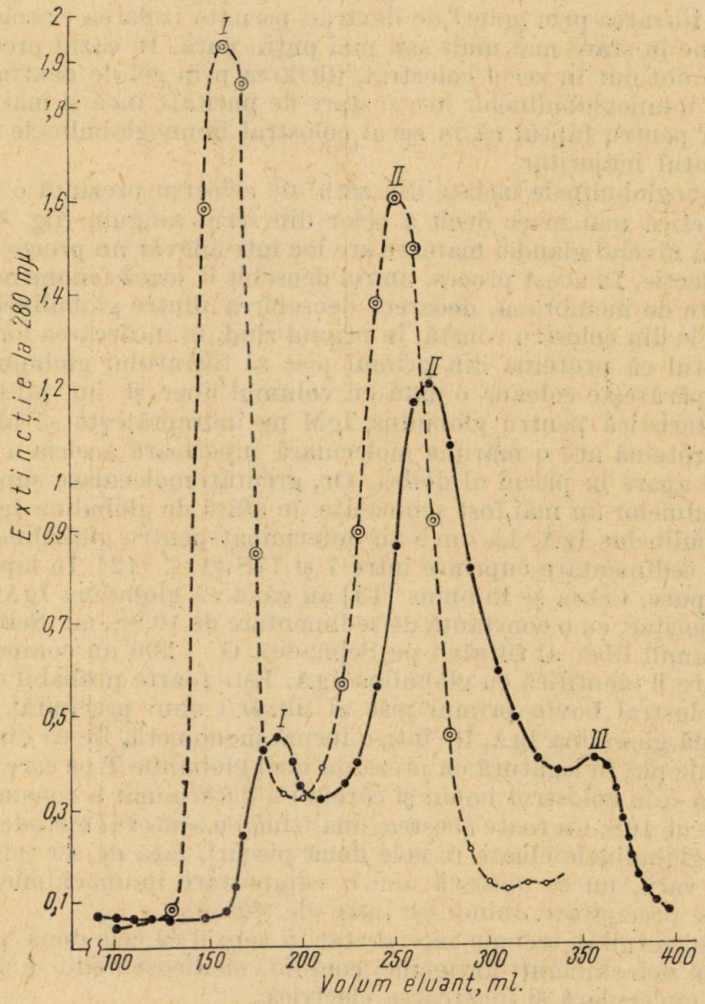


Fig. 1. — Diagrama de filtrare prin gel de Sephadex G—200 a : 10 ml dintr-o soluţiede 2,43 g% precipitat globulinic sanguin (linia continuă) ; 10 ml dintr-o soluţie de 10,80 g % precipitat globulinic colostral (linia întreruptă).

unui spot electroforetic mai larg, cu aspect neomogen (fig. 2 *g*) şi cu o mobilitate electroforetică mai mare decît a omologului său obţinut la filtrarea precipitatului globulinic sanguin. Analiza imunoelectroforetică reliefează un arc major în zona globulinelor IgG, precum şi un arc minor, mai puţin intens, foarte asemănător cu imaginea primului pisc şi care reprezintă impurificarea globulinelor din piscul al doilea cu urme de globuline

din primul pisc (fig. 3 *g*). Nu s-au identificat linii de precipitare caracteristice globulinei IgM în piscurile de filtrare ale precipitatului globulinic de zer colostral.

Din rezultatele obținute se poate vedea că în cazul γ — globulinelor sanguine, filtrarea prin geluri de dextran permite izolarea claselor de imunoglobuline în stare mai mult sau mai puțin pură. În cazul precipitatului globulinic obținut în zerul colostral, filtrarea prin gel de dextran permite obținerea imunoglobulinelor într-o stare de puritate încă și mai înaintată, aceasta și pentru faptul că în zerul colostral imunoglobulinele reprezintă componentul majoritar.

Imunoglobulinele izolate din zerul de colostru prezintă o mobilitate electroforetică mai mare decît a celor din serul sanguin (fig. 4), ceea ce arată că la nivelul glandei mamare are loc într-adevăr un proces fizico-chimic de selecție. In acest proces, un rol deosebit îl joacă fenomenele de permeabilitate de membrană, deoarece deosebirea dintre globulinele IgG din sînge și cele din colostru constă, în primul rînd, în încărcarea lor electrică.

Faptul că proteina din primul pisc al filtratului globulinic de zer colostral părăsește coloana o dată cu volumul liber și nu prezintă o linie caracteristică pentru globulina IgM ne îndreptățește să afirmăm că această proteină are o mărime moleculară superioară aceleia a globulinei IgG, care apare în piscul al doilea. Or, greutăți moleculare superioare 7S IgG globulinelor au mai fost semnalate, în afară de globulina IgM, pentru clasa globulinelor IgA. La om s-au determinat pentru globulina IgA constante de sedimentare cuprinse între 7 și 17S [11], [12]. În laptele colostral de iepure, Cebra și Robbins [13] au găsit că globulina IgA este compusul majoritar, cu o constantă de sedimentare de 10,8S, iar Sell [14] obține în volumul liber al filtrării pe Sephadex G — 200 un component proteic pe care îl identifică cu globulina IgA. Este foarte probabil ca în cazul zerului colostral bovin primul pisc al filtrării unui precipitat globulinic să cuprindă globulina IgA, fie într-o formă monomeră, fie ca dimer. Acest fapt trebuie pus în legătură cu prezența unei globuline T pe care Smith [7] a semnalat-o în colostrul bovin și căreia i-a determinat o constantă de sedimentare de 10S. Cu toate acestea, analizînd cu ajutorul metodei Ouchterlony γ — globulinele eluate în cele două piscuri, față de ser imun anticolostru de vacă, nu se observă nici o comportare imunochimică diferită, arcurile de precipitare unindu-se între ele (fig. 5).

Acest rezultat trebuie interpretat în sensul că cele două γ — globuline posedă determinanți antigenici comuni, ele deosebindu-se numai prin greutatea moleculară și încărcarea electrică.

Lucrări privind caracterizarea imunochimică a globulinei colostrale izolate în primul pisc al filtrării pe Sephadex G-200 a zerului colostral bovin sînt în curs.

CONCLUZII

Din rezultatele obținute se constată că filtrarea pe gel de Sephadex G-200 permite separarea globulinei IgM de globulinele IgA și IgG în cazul analizării unui precipitat globulinic sanguin, respectiv separarea a două globuline din precipitatul globulinic colostral cu mobilitate electroforetică mai mare decît a celor din serul sanguin.

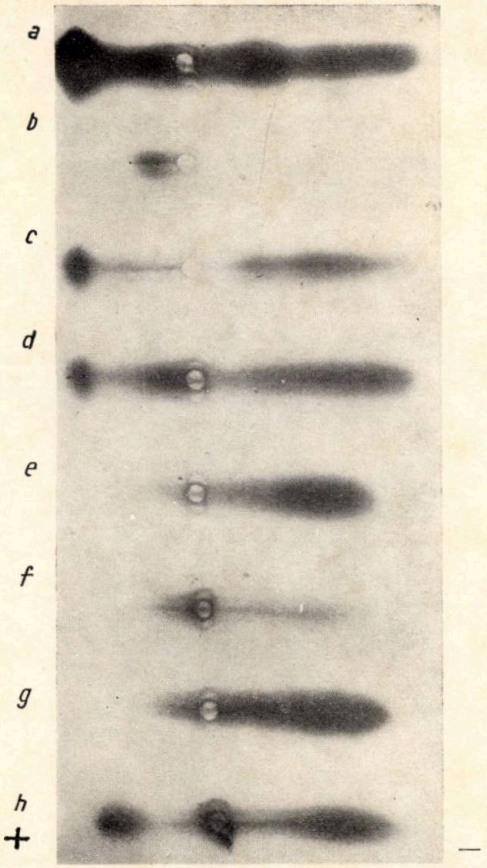


Fig. 2. — Analiza electroforetică a piscurilor filtrate și concentrate și a precipitatelor globulinice.

a — ser sanguin bovin; *b* — pisc *I* precipitat globulinic sanguin; *c* — pisc *II* precipitat globulinic sanguin; *d* — precipitat globulinic sanguin, nefracționat; *e* — precipitat globulinic colostral, nefracționat; *f* — pisc I precipitat globulinic colostral; *g* — pisc *II* precipitat globulinic colostral; *h* — zer colostral.

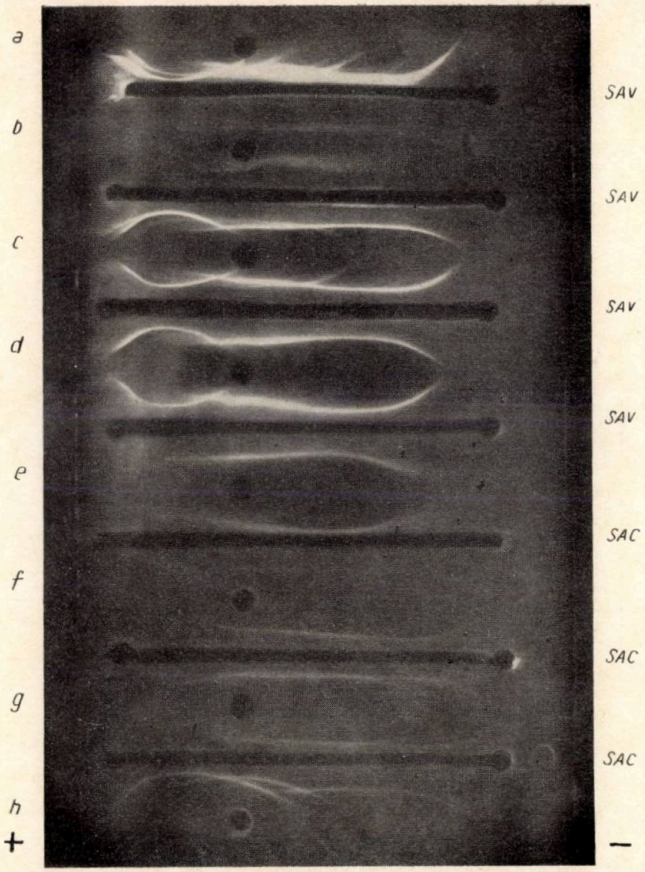


Fig. 3. — Analiza imunoelectroforetică a piscurilor filtrate și concentrate și a precipitatelor globulinice.

a — ser sanguin bovin; *b* — pisc *I* precipitat globulinic sanguin; *c* — pisc *II* precipitat globulinic sanguin; *d* — precipitat globulinic sanguin, nefracționat; *e* — precipitat globulinic colostral, nefracționat; *f* — pisc *I* precipitat globulinic colostral; *g* — pisc *II* precipitat globulinic colostral; *h* — zer colostral. SAV = ser imun antiser total de vacă; SAC = ser imun anticolostru total de vacă.

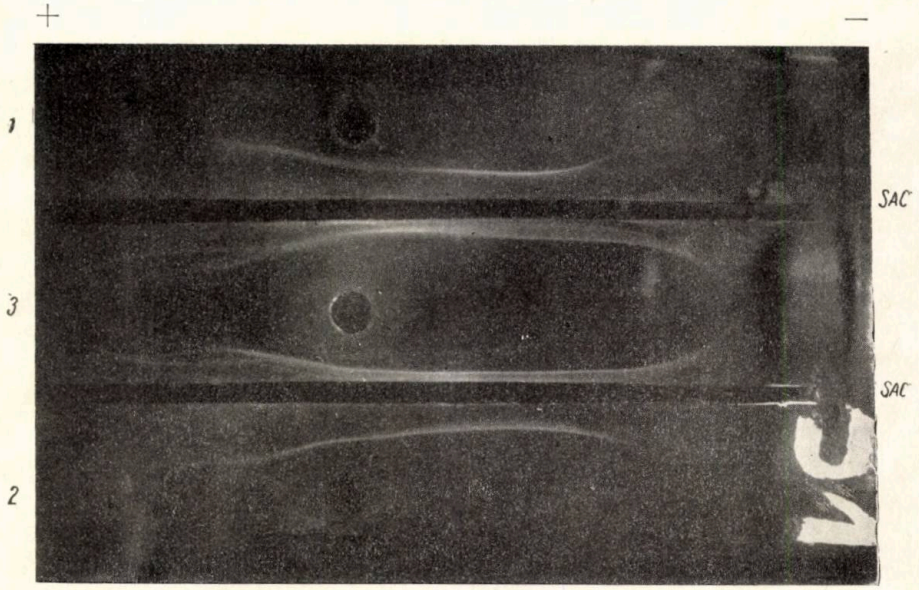


Fig. 4. — Imunoelectroforegrama piscurilor *I(1)* şi *II(2)* a filtratelor precipitatului globulinic colostral comparate cu precipitatul globulinic sanguin (*3*) ; SAC = ser imun anticolostru total de vacă.

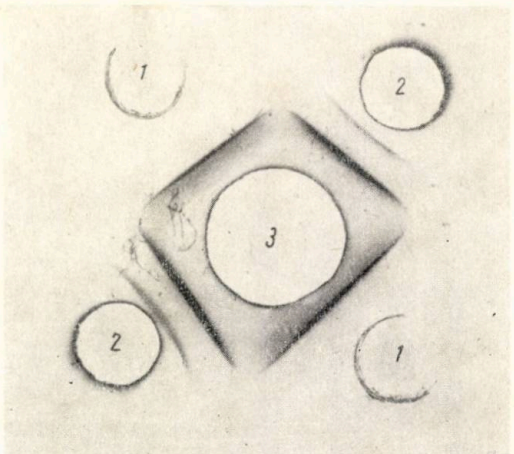


Fig. 5. — Reacţia de dublă difuzie a piscurilor *I(1)* şi *II(2)* a filtratului de precipitat globulinic colostral cu ser imun anticolostru total de vacă (*3*).

În primul pisc al filtrării globulinelor colostrale s-a identificat o globulină cu greutate moleculară mare şi care conţine determinanţi antigenici comuni cu globulina de tip 7S, izolată în piscul al doilea.

Prezentată la redacţie la 5 iulie 1968

Catedra de chimie biologică I,
Institutul de medicină şi farmacie, Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. T. L. Mc Meekin, H. Neurath, K. Bailey, *The Proteins*, Academic Press Inc., New York, 1954, *IIA*.
2. D. Gh. Popovici, N. Vermeşan, G. Jurencova, V. V. Micuşan, T. Bilbie, Lucr. şt. I.C.Z., **XXI**, 301 (1964).
3. D. Gh. Popovici, V. V. Micuşan, St. cerc. biochim., **6**, 39 (1963).
4. B. L. Larson, J. Dairy Sci., **41**, 1033 (1958).
5. F. A. Murphy, Ole Aalund, W. Osebold, E. J. Carroll, Arch. Biochem. Biophys., **108**, 230 (1964).
6. A. E. Pierce, J. Hyg. Cambr., **53**, (1955).
7. E. L. Smith, J. biol. Chem., **164**, 148 (1946).
8. L. A. Hanson, Experientia, **XV**, 471 (1959).
9. V. V. Micuşan, Lucia Buzilă, Rev. roum. Biochim., **1**, 169 1(964).
10. V. Gheţie, V. V. Micuşan, *Analiza imunochimică*, Edit. Academiei, Bucureşti, 1966.
11. R. E. Balliex, J. W. Imhof, G. H. Niehaus, Nature, **189**, 768 (1961).
12. J. F. Heremans, J. P. Vaerman, A. O. Carbonara, J. A. Rodhain, M. Th. Heremans, *PEETERL'S PROTIDES BIOLOGICAL FLUIDS*, Proceedings 10th Colloquium, Bruges, ed. Elsevier, Amsterdam, 1962.
13. J. J. Cebra, J. B. Robbins, J. Immunol., **97**, 12 (1966).
14. S. Sell, Immunochemistry, **4**, 49 (1967).

IMMUNOELECTROPHORETICAL CHARACTERIZATION OF γ—GLOBULINS FROM BOVINE BLOOD SERUM AND COLOSTRAL MILK ISOLATED BY DEXTRAN GEL FILTRATION

SUMMARY

The filtration on dextran gel of globulin precipitates obtained from bovine blood serum and colostral whey allows the isolation of certain types of γ — globulins which are distributed between two filtration peaks. The blood globulin precipitate in the first peak contains the IgM globulin while the second one, the IgG globulin along with other serum protein. In the first peak, the filtration of the whey globulin precipitate reveals the presence of a certain type of globulin with similar immunochemical properties as IgG globulin. The second peak contains the IgG globulin contaminated with traces of the globulin in the first peak. The immunochemical behaviour of colostral globulin eluted in the first peak on Sephadex G-200 filtration is discussed.

ST. CERC. BIOCHIM., 12, 1, 59—61 (1969)

VARIAȚIILE ENDOSMOZEI IODULUI ÎN COLUL UTERIN NORMAL ȘI PATOLOGIC

ANGELA MIHĂESCU și ALEXANDRINA POPESCU

Rezumat. — Soluția apoasă de iod N/100 în contact cu exocolul uterin timp de 10 min s-a dovedit a fi avantajoasă pentru cercetarea deosebirilor de permeabilitate pentru iod a exocolurilor normale și patologice.

Permeabilitatea țesuturilor patologice pentru diferite substanțe se deosebește adesea de aceea a țesuturilor normale corespunzătoare. Aceasta înseamnă că în anumite împrejurări cunoașterea permeabilității unui țesut pentru anumite substanțe poate servi ca indice pentru caracterizarea stării țesutului respectiv. De aceea, într-o lucrare precedentă am elaborat o metodă adecvată în vederea cercetării permeabilității pentru iod a exocolului uterin normal și patologic [1] pentru a stabili dacă și în acest caz se manifestă unele deosebiri caracteristice. Cu ajutorul acestei metode am obținut unele rezultate care ne-au confirmat că exocolul patologic este mai permeabil pentru iod decît exocolul normal [2].

În lucrările menționate, cercetările au fost efectuate folosindu-se soluția de iod $N/200$, care se menținea în contact cu colul uterin timp de 10 min. A rămas însă de stabilit dacă soluțiile de iod de alte concentrații și alte durate de contact între soluție și col ar fi mai favorabile pentru sesizarea deosebirilor de permeabilitate între colul normal și patologic. De aceea, în lucrarea de față am cercetat endosmoza iodului în exocoluri uterine normale și patologice din soluții de iod de concentrații $N/100$, $N/200$ și $N/400$, iar pentru urmărirea mersului endosmozei la fiecare din concentrațiile menționate lăsam 20 ml soluție în contact cu exocolul uterin timp de 30 min și recoltam din ea probe a cîte 5 ml după 10, 20 și 30 min. Titrările acestor probe s-au făcut cu soluții de tiosulfat de sodiu de aceeași normalitate cu soluțiile de iod luate în cercetare.

Am efectuat 140 de determinări pe coluri uterine normale și 52 de determinări pe coluri uterine patologice (cancer, eroziuni, inflamații etc.). Stările patologice ale colurilor au fost verificate prin examene clinice, colposcopice și histopatologice pre- sau postoperatorii. Rezultatele obținute sînt cuprinse în tabela 1. Cifrele reprezintă valorile medii, exprimate în mg, ale cantității de iod pătrunse în exocol din cele trei soluții de iod menționate.

Din examinarea datelor obţinute constatăm următoarele :

a) Cantitatea de iod ce pătrunde din soluţie în exocol creşte pe măsura trecerii timpului la toate concentraţiile folosite şi la toate exocolurile atît normale, cît şi patologice.

Tabela 1

Endozmoza iodului (mg) în exocoluri normale (En) şi patologice (Ep) din soluţii de iod de concentraţii diferite şi în decursul diferitelor perioade de timp

Concentraţia soluţiei de iod	Cantitatea iodului (mg) pătrunsă în exocol în decurs de :					
	10 min		20 min		30 min	
	En	Ep	En	Ep	En	Ep
N/100	0,54±0,14	1,16±0,23	1,13±0,32	1,53±0,23	1,62±0,21	2,45±0,36
N/200	0,37±0,07	0,83±0,15	0,49±0,08	1,20±0,31	0,94±0,16	1,80±0,30
N/400	0,23±0,08	0,42±0,12	0,38±0,10	0,54±0,20	0,54±0,12	0,97±0,16

b) Cantitatea de iod ce pătrunde din soluţie în exocoluri atît normale, cît şi patologice într-o anumită perioadă de timp este cu atît mai mare cu cît iodul în soluţie este mai concentrat.

c) Cantităţile de iod ce pătrund în aceleaşi condiţii experimentale în exocoluri uterine patologice sînt mult mai mari decît cele care pătrund în exocoluri normale.

d) Diferenţele cele mai avantajoase pentru cercetări se obţin cu soluţii $N/100$ şi $N/200$, timpul de contact fiind de 30 min ; cum însă intervalul de 30 min este prea lung pentru cercetări *in situ*, socotim că se poate lucra destul de bine cu soluţie $N/100$ de iod, timpul de contact fiind de 10 min.

Constatările de mai sus arată că procedeul menţionat poate constitui o metodă nouă de explorare a stării exocolului. Această metodă este avantajoasă, întrucît se execută *in situ*, nu necesită prelevare de ţesut şi este obiectivă, deoarece permite caracterizarea stării exocolului prin aprecierea cantitativă a permeabilităţii ţesutului pentru iod.

Prezentată la redacţie la 26 octombrie 1968

Catedra de biochimie a Facultăţii de biologie,
Universitatea Bucureşti
Maternitatea
Filantropia, Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. E. Macovschi, A. Mihăescu, A. Popescu, St. cerc. biochim., **5**, 113 (1962).
2. A. Popescu, A. Mihăescu, M. Dragnea, Revista de obstetrică şi ginecologie, **14**, 521 (1966).

VARIATIONS OF IODINE ENDOSMOSIS IN NORMAL AND PATHOLOGICAL UTERINE CERVIX

SUMMARY

The aqueous N/100 iodine solution in contact with uterine cervix during 10 minutes has been proved to be advantageous in the investigation of the differences in the permeability to iodine of normal and pathological cervixes.

ST. CERC. BIOCHIM., 12, 1, 63–68 (1969)

ASPECTE DIN BIOCHIMIA SCOARȚEI DE PLOP INFECTATE DE *DOTHICHIZA POPULEA* SACC. ET BR.

NOTA II

VICTORIA MOCANU și IOANA TĂNASE

Rezumat. — Atacul ciupercii *Dothichiza populea* Sacc. et Br. produce în scoarța de plop o dereglare a echilibrului biochimic normal la nivelul aminoacizilor liberi și legați, al glucidelor, clorofilelor și acizilor grași nesaturați.

Este cunoscut faptul că ciuperca *Dothichiza populea* Sacc. et Br. s-a dovedit în ultimul timp, în Europa, unul din cei mai periculoși paraziți ai plopilor, în special ai plopilor euramericani [1] — [6].

În numeroase lucrări de specialitate sînt prezentate date cu privire la modul diferit de comportare a unor specii, sorturi și clone de plop față de atacul ciupercii *Dothichiza populea* Sacc. et Br., unele specii, sorturi și clone dovedindu-se receptive la atacul ciupercii, iar altele relativ rezistente [7], [8].

Cercetările recente au arătat că sensibilitatea diferită a plopului la atacul acestei ciuperci depinde de posibilitatea de apărare a plantei, ca rezultat al formării unor substanțe de protecție, cu rol fungistatic, care se acumulează în țesuturile ei [9] — [13].

Se impune astfel luarea unor măsuri corespunzătoare de prevenire a infectării plopilor și de mărire a rezistenței lor la atacul ciupercii *Dothichiza populea* Sacc. et Br.

Dar, pentru a se putea stabili metode eficace de luptă, bazate atît pe o acțiune directă asupra agentului patogen, cît și pe efecte indirecte, care să promoveze rezistența plantei, este necesar să se cunoască mai întîi, pentru principalele sorturi și clone de plop din cultură, aspectele metabolice ale constituenților celulari, și anume dezechilibrele biochimice induse de ciupercă asupra plantei-gazdă la toate nivelele organizării sale biologice.

În acest fel se va crea o bază științifică în cunoașterea susceptibilității plantelor față de agenții patogeni, în selecționarea unor sorturi și clone de plop cu receptivitate scăzută la atacul ciupercii menționate și în luarea măsurilor de prevenire și combatere a acestei boli.

Pînă în prezent, în țara noastră nu au fost efectuate studii asupra scoarței clonelor de plopi euramericani.

Într-o publicație recentă [15] am prezentat rezultatele cercetărilor noastre efectuate în scoarța sănătoasă la unele sorturi și clone de plopi negri.

Lucrarea de faţă are drept scop să determine dacă există modificări în cantitatea şi calitatea aminoacizilor liberi şi legaţi, a glucidelor, clorofilelor şi acizilor graşi nesaturaţi, ca o consecinţă a infecţiei cu *Dothichiza populea* Sacc. et Br. în scoarţa clonelor 'R_{-16}' şi 'R_{-20}'.

MATERIAL ŞI METODĂ

S-a folosit scoarţă de plop — *Populus* x *euramericana* (Dode) Guinier cv. '*Robusta*' Hîrşova, clonele R_{16} şi R_{20}, puieţi de 2 ani, sănătoşi şi infectaţi pe cale naturală de *Dothichiza populea* Sacc. et Br. Scoarţa s-a recoltat în aprilie 1967 din următoarele localităţi : Pepiniera centrală Hîrşova (clona 'R_{-16}') şi Calafat — Răscruci (clona 'R_{-20}').

Plantele de experienţă au fost grupate în trei loturi la clona 'R_{-16}' şi în patru loturi la clona 'R_{-20}', fiecare lot fiind alcătuit din 25 de exemplare.

Lotul I îl constituie martorul — puieţi sănătoşi, iar loturile II, III şi IV sînt constituite din puieţi infectaţi de *Dothichiza populea* Sacc. et Br., prezentînd simptome diferite ale bolii, cauzate de ciuperca menţionată. Astfel, în lotul II sînt puieţii infectaţi care prezintă pe scoarţă pete brune, în lotul III sînt cuprinşi puieţi infectaţi avînd pe scoarţă pete portocalii şi picnidiile ciupercii, iar lotul IV cuprinde puieţi infectaţi care prezintă pete portocalii şi picnidiile ciupercii *Dothichiza populea* Sacc. et Br., precum şi picnidiile ciupercii *Cytospora chrysosperma* (Pers.) Fr., agent saprofit instalat pe scoarţa deja uscată de *Dothichiza populea*.

S-au recoltat aproximativ 100 g scoarţă proaspătă din fiecare lot de experienţă în parte.

Prelucrarea scoarţei şi procedeul de extracţie şi analiză cantitativă a aminoacizilor liberi şi a celor legaţi în structuri proteice, a glucidelor, clorofilelor şi acizilor graşi nesaturaţi s-au făcut în condiţiile de metodă descrise într-o lucrare anterioară, folosindu-se cromatografia de partiţie [15].

Identificarea compuşilor separaţi s-a făcut prin cromatografie cu substanţe cunoscute, în mai multe sisteme de solvenţi, ca şi prin teste chimice speciale pentru fiecare component în parte.

Aminoacizii prezenţi pe cromatogramă în cantităţi prea mici pentru eluţie (1 μg sau mai puţin) s-au apreciat ca urme. Nu s-au luat în considerare decît acei aminoacizi care au prezentat reproductibilitate a R_f-ului pentru şase determinări succesive, cromatografiate în condiţii identice şi care au corespuns identificării la proba martorului extern, intern şi la reacţii specifice.

REZULTATE

Analiza aminoacizilor liberi şi a celor legaţi în structuri proteice, a glucidelor, a acizilor graşi nesaturaţi şi a clorofilelor din scoarţa celor două clone de plop studiate ne-a condus la următoarele rezultate :

În extractele acetonice din scoarţă, precum şi în hidrolizatele acide s-au pus în evidenţă cromatografic 20 de compuşi, care dau reacţie pozitivă cu ninhidrina, dintre care numai 12 s-au putut identifica la clona 'R_{-16}'

și 14 la clona 'R_{-20}' (fig. 1 *A*, *B*). Conținutul total în aminoacizi liberi scade la aproximativ jumătate în scoarța clonelor 'R_{-16}' și 'R_{-20}' infectate cu *Dothichiza populea* Sacc. et Br., scădere care se accentuează în diferitele forme de manifestare ale bolii (tabela 1). La clona 'R_{-16}' se remarcă dispariția completă din fondul de aminoacizi liberi a tirozinei, metioninei și fenilalaninei (fig. 1 *A*).

Tabela 1

Conținutul în aminoacizi liberi din scoarța de *Populus* × *euramericana* (Dode) Guinier cv. '*Robusta*' proveniența Hîrșova, clonele 'R_{-16}' și 'R_{-20}', sănătoasă și infectată cu *Dothichiza populea* Sacc. et Br.

Denumirea clonei de plop	Aminoacizi liberi mg%/g produs uscat			
	I	II	III	IV
Populus × *euramericana* (Dode) Guinier cv. '*Robusta*' proveniența Hîrșova 'R_{-16}'	451 ± 50	212* ± 14	168* ± 15	–
Idem 'R_{-20}'	388 ± 21	131* ± 14	61* ± 2,5	41 ± 5,4

* $T > 2,5$; $P < 0,01$ I – scoarță sănătoasă; II – scoarță infectată prezentînd pete brune; III = scoarță infectată prezentînd pete portocalii și picnidii; IV = scoarță infectată prezentînd pete portocalii și picnidii de *Dothichiza populea*, precum și picnidii de *Cytospore chrysosperma*.

Cantitatea totală de aminoacizi legați se modifică în scoarța clonelor infectate, și anume : scade în mod simțitor în scoarța clonei 'R_{-16}' infectată, care prezintă pete portocalii și picnidii, și crește în scoarța clonei 'R_{-20}'. Suprapunerea acțiunii saprofitului *Cytospora chrysosperma* (Pers.) Fr. în scoarța de plop infectată de *Dothichiza populea* la clona 'R_{-20}' determină o scădere mai accentuată a aminoacizilor legați, cu dispariția completă a cisteinei, metioninei și tirozinei (fig. 1 *B*, tabela 2).

Tabela 2

Conținutul în aminoacizi totali din scoarța de *Populus* × *euramericana* (Dode) Guinier cv. '*Robusta*' proveniența Hîrșova, clonele 'R_{-16}' și 'R_{-20}' sănătoasă și infectată cu *Dothichiza populea* Sacc. et Br.

Denumirea clonei de plop	Aminoacizii totali g%/g produs uscat			
	I	II	III	IV
Populus × *euramericana* (Dode) Guinier cv. '*Robusta*' proveniența Hîrșova 'R_{-16}'	3,9 ± 0,25	2,1* ± 0,13	1,96* ± 0,12	–
Idem 'R_{-20}'	2,5 ± 0,16	3,3* ± 0,2	3,68* ± 0,15	1,03* ± 0,06

* $T > 2,5$; $P < 0,01$. I–IV. Vezi explicațiile la tabela 1.

În extractele alcoolice din scoarța de plop a clonelor studiate s-a pus în evidență prezența mai multor componente glucidice, printre care celobioza, glucozamina, ramnoza, glucoza și fructoza. Se constată modificări însemnate la nivelul componentelor menționate în scoarța de plop infectată de *Dothichiza populea*, și anume o reducere însemnată în conținutul acestor componente glucidice, cu dispariția completă a tuturor com-

ponentelor în faza avansată de atac, cînd boala se manifestă sub formă de pete portocalii şi picnidii, la clona 'R_{-20}'. La acelaşi stadiu de infectare, în scoarţa clonei 'R_{-16}' se constată prezenţa unor cantităţi reduse de ramnoză, glucoză şi fructoză, primele componente care dispar total fiind glucozamina şi celobioza (tabela 3, fig. 2 *A*, *B*).

Tabela 3

Conţinutul total în glucide libere d n scoarţa de *Populus* × *euramericana* (Dode) Guinier c.v. '*Robusta*' provenienţa Hîrşova, clonele 'R_{-16}' şi 'R_{-20}' sănătoasă şi infectată de *Dothichiza populea* Sacc. et Br. (g% produs uscat)

Denumirea clonei de plop	Glucide libere (g%g produs uscat)			
	I	II	III	IV
Populus × *euramericana* (Dode) Guinier c.v. '*Robusta*' provenienţa Hîrşova 'R_{-16}',	3,2± 0,13	0,8*± 0,13	0,1*± 0,03	–
Idem 'R_{-20}',	1,24± 0,02	0,4*± 0,01	–	–

* $T > 2{,}5$; $P < 0{,}01$.

Din scoarţa de plop sănătoasă s-au izolat trei acizi graşi nesaturaţi, şi anume : oleic, linoleic şi linolenic (tabela 4). În scoarţa clonei 'R_{-16}' infectată de *Dothichiza populea* nu s-au pus în evidenţă decît acizii oleic şi linoleic. Conţinutul în cei trei acizi graşi nesaturaţi scade mult în scoarţa clonei 'R_{-20}' la atacul cu *Dothichiza populea* (tabela 4).

Tabela 4

Conţinutul în acizi graşi nesaturaţi din scoarţa de *Populus* × *euramericana* (Dode) Guinier c.v. '*Robusta*' provenienţa Hîrşova, clonele 'R_{-16}' şi 'R_{-20}' sănătoasă şi infectată de *Dothichiza populea* Sacc et Br. (g% produs uscat)

		I	II	III	IV
'R_{-16}'	Acid oleic	8±0,3	2*±0,02	3,2*±0,04	–
	Acid linoleic	4±0,1	0,7*±0,08	0,5*±0,2	–
	Acid linolenic	0,3±0,06	–	–	–
'R_{-20}'	Acid oleic	5±0,4	3,4*±0,05	1,9*±0,06	2,2*±0,04
	Acid linoleic	1,1±0,03	0,9*±0,1	0,6*±0,08	0,1*±0,03
	Acid linolenic	0,9±0,08	0,7±0,06	0,3*±0,09	0,07*±0,06

* $T > 2{,}5$; $P < 0{,}01$. I–IV, Vezi tabela 1.

DISCUŢII

După Rama, gradul de susceptibilitate al unei plante la o maladie depinde de caracterele sale fiziologice şi biochimice [13].

Compoziţia biochimică a plantei este rezultatul modificărilor ce au loc în metabolismul ei. Rubin a arătat că metabolismul plantei constituie substratul de bază pentru reacţiile activ proteative de apărare din ţesuturi în timpul contactului cu parazitul [14].

Modificările cantitative observate de noi în scoarţa clonelor 'R_{-16}' şi 'R_{-20}' infectată de *Dothichiza populea* Sacc. et Br., la nivelul aminoacizilor,

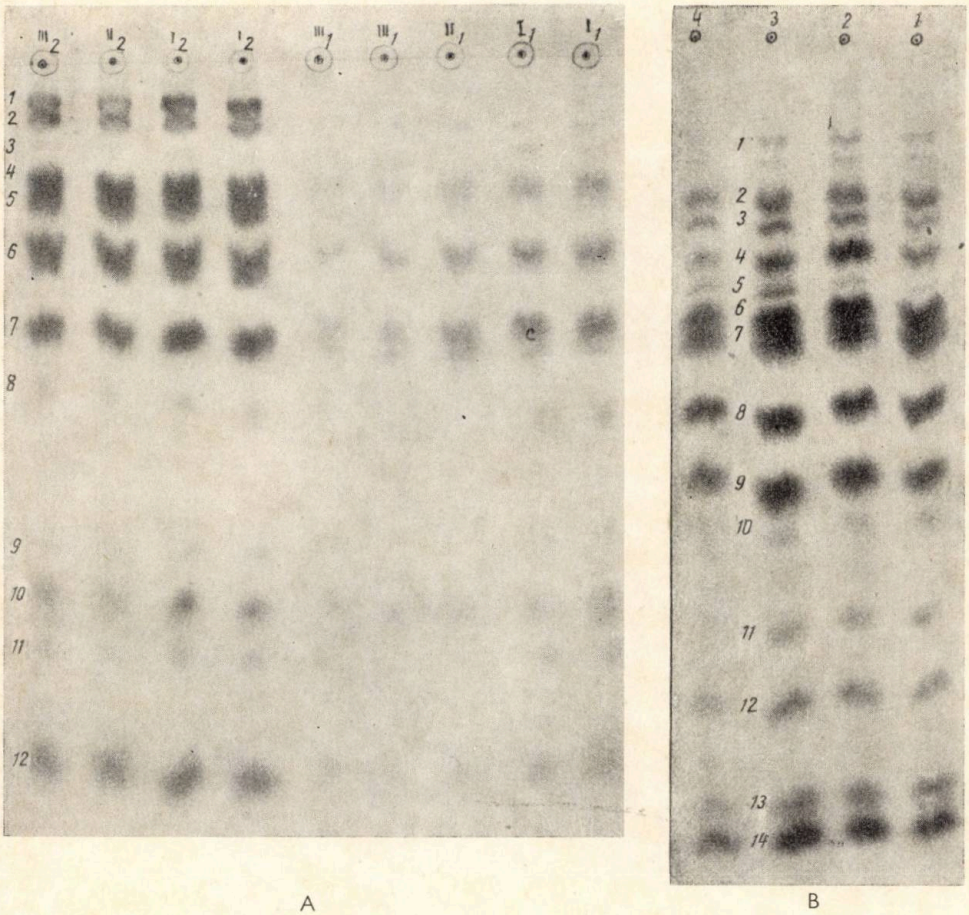


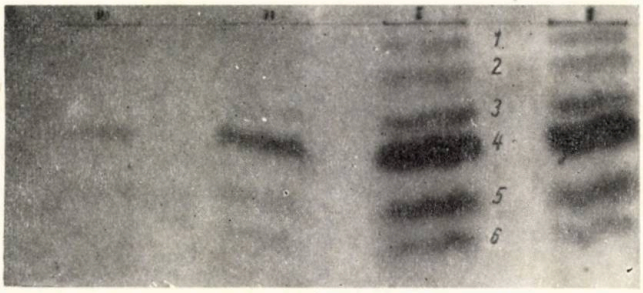
Fig. 1. — Cromatograma aminoacizilor liberi şi legaţi din scoarţa de *Populus* × *euramericana* (Dode) Guinier cv. '*Robusta*' Hîrşova, clonele 'R_{-16}' şi 'R_{-20}', sănătoasă şi infectată de *Dothichiza populea* Sacc. et Br.

A = Clona 'R_{-16}' II_1, I_1, III_1 = aminoacizi liberi; I_2, II_2, III_2 = aminoacizi legaţi *I.* = scoarţă sănătoasă; *II* = scoarţă infectată prezentînd pete brune; *III* = scoarţă infectată prezentînd pete portocalii şi picnidii.

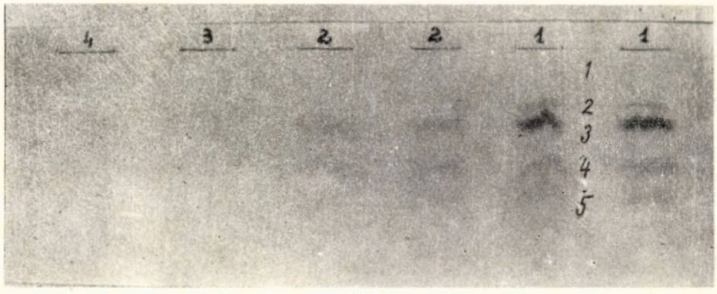
Ordinea aminoacizilor: *1* = lizină; *2* = histidină; *3* = arginină; *4* = serină; *5* = glicocol; *6* = acid glutamic + treonină; *7* = α − alanină; *8* = tirozină; *9* = metionină; *10* = valină; *11* = fenilalanină; *12* = leucină.

B = *clona* 'R_{-20}': *1* = scoarţă sănătoasă − martor; *2* = scoarţă infectată prezentînd pete brune; *3* = scoarţă infectată cu pete portocalii şi picnidii; *4* = scoarţă infectată prezentînd pete portocalii cu picnidii de *Dothichiza populea*, precum şi picnidii de *Cytospora chrysosperma*.

Ordinea aminoacizilor: *1* = cisteină; *2* = lizină; *3* = histidină; *4* = arginină; *5* = cistină; *6* = serină; *7* = glicocol; *8* = acid glutamic + acid aspartic; *9* = α − alanină; *10* = tirozină; *11* = metionină; *12* = valină; *13* = fenilalanină; *14* = leucină.



A



B

Fig. 2. — Cromatograma glucidelor libere din scoarţa de *Populus* × *euramericana* (Dode) Guinier cv. '*Robusta*' Hîrşova, clonele 'R_{-16}' şi 'R_{-20}', sănătoasă şi infectată de *Dothichiza populea*.

A = Clona 'R_{-16}'; *1* = celobioză; 2 = glucozamină; *3* = ?; *4* = ramnoză; *5* = glucoză; *6* = fructoză *I*, *II*, *III* = vezi explicaţiile fig. 1, clona R_{-16}. *B* = clona 'R_{-20}'; *1* = celobioză; *2* = glucozamină; *3* = ramnoză; *4* = glucoză; *5* = fructoză *1*, *2*, *3*, *4* = vezi explicaţiile la fig. 1, clona 'R_{-20}'.

glucidelor și acizilor grași nesaturați, presupun existența unui dezechilibru metabolic la unele trepte ale organizării biologice, induse de ciupercă, ca rezultat al unei interacțiuni metabolice în cuplul gazdă-parazit.

Măsurile de apărare a plantei-gazdă prin intensificarea proceselor metabolice se dovedesc a fi insuficiente pentru a se putea menține un echilibru biochimic normal.

Se poate presupune astfel că pierderile ce au loc în conținutul aminoacizilor liberi din scoarța clonelor 'R_{-16}' și 'R_{-20}' infectată de *Dothichiza populea* Sacc. et Br., în diferite stadii de evoluție ale bolii, s-ar datora unei inhibări a activității enzimatice proteolitice. Aceasta ar fi rezultatul elaborării de către ciupercă a unor substanțe toxice de inhibare a activității proteazice, care apare o dată cu specializarea biologică a ciupercii și cu crearea sistemelor enzimatice de adaptare și dezvoltare a acesteia pe planta-gazdă. De asemenea, s-ar putea ca aminoacizii liberi din scoarța clonelor menționate să fie folosiți de ciupercă pentru dezvoltarea ei [16] sau la formarea de peptide toxice. Pe de altă parte, un conținut crescut în aminoacizi totali la clona 'R_{-20}' în primele două stadii de evoluție a bolii, după care scade la aproximativ 50% din valoarea normală, poate fi asociat cu o sinteză proteică crescută în această perioadă, ca regulă caracteristică de rezistență inițială a plantei, față de agentul patogen.

Modificările diferite observate în conținutul aminoacizilor totali la cele două clone infectate cu *Dothichiza populea* s-ar datora caracteristicilor biochimice specifice fiecărei clone, care de altfel provin din condiții de dezvoltare diferite (localități diferite).

Nu este exclus ca rolul decisiv în lupta de apărare a plantei-gazdă să fie determinat de formarea compușilor cu azot în cursul degradării și sintezei proteice cu rol activ în reacțiile de rezistență, participînd în măsură mai mare sau mai mică la mecanismele de apărare ale acesteia.

Dispariția acidului linolenic din scoarța clonei 'R_{-16}' presupune existența unei modificări biochimice însemnate, indusă de ciupercă, la nivelul acestui compus.

Se pare astfel că există o corelație între rezistența clonelor 'R_{-16}' și 'R_{-20}' la parazitul *Dothichiza populea* Sacc. et Br. și proprietățile biochimice ale plantei-gazdă.

Nu este exclus ca infecția cu *Dothichiza populea* Sacc. et Br. să afecteze cele trei metabolisme principale (protidic, glucidic și lipidic) în întreaga plantă. Se impune astfel efectuarea unui studiu privind biochimia plantei în totalitate, pentru a se putea ajunge la concluzia dacă efectele acțiunii agentului patogen sînt sistemice sau sînt rezultate din modificări fiziologice ce se produc la locul de infecție.

Efectele biochimice observate în infecția cu *Dothichiza populea* Sacc. et Br. pot folosi atît ca un indiciu în selecționarea compușilor chimici naturali sau de sinteză pentru o promovare efectivă a vigurozității plantei, cît și de găsire a unor teste biochimice de depistare precoce a bolii, înainte ca aceasta să atingă nivelele macroscopice.

Datele experimentale obținute de noi ajută la explicarea componentelor de toleranță a mecanismului de rezistență, strîns legat de fiziologia plantei. Tabelele 1 — 4 arată că există o acțiune toxic înaltă a ciupercii *Dothichiza populea* Sacc. et Br. și o pronunțată susceptibilitate la atacul ciupercii a clonelor cercetate.

CONCLUZII

1. Atacul ciupercii *Dothichiza populea* Sacc. et Br. produce în scoarţa clonelor de plop cercetate ('R_{-16}' şi 'R_{-20}') o dereglare a echilibrului biochimic normal la nivelul celor trei cicluri metabolice principale, şi metabolismul protidic, glucidic şi lipidic.

2. Conţinutul total în aminoacizi liberi şi legaţi scade la aproximativ 50% în scoarţa infectată.

3. Suprapunerea acţiunii saprofitului *Cytospora chrysosperma* determină modificări însemnate în conţinutul aminoacizilor legaţi, mai cu seamă la nivelul cisteinei, tirozinei şi metioninei.

4. Zaharurile libere prezintă valori scăzute faţă de normal, cu dispariţia completă în faza avansată de atac.

5. Conţinutul în acizi graşi nesaturaţi scade în scoarţa clonei 'R_{-20}' infectată de *Dothichiza populea* Sacc. et Br.

Prezentată la redacţie la 12 iunie 1968

Institutul de cercetări forestiere,
Staţiunea cultura plopului „Cornetu" şi
Colectivul de chimioterapie,
Academia Republicii Socialiste România

BIBLIOGRAFIE

1. R. Leontovyc *Dothichiza populea şi combaterea ei, Publ. Depart. Cons. slovac de stat pentru agricultură*, Bratislava, 1962.
2. R. Leontovyc, Vedicke Prage, *1*, 233 (1960).
3. S. Schönhar, Der Forst und Holzwirt, **24**, 421 (1957).
4. S. Schönhar, Allg. Forstzeitschrift, *47*, 824 (1959).
5. I. C. Popescu, *Realizări noi în cultura plopilor*, Publ. I.D.T., Bucureşti, 1965.
6. D. Rădoi, *Protecţia plopului*, Edit. agrosilvică, Bucureşti, 1961.
7. H. Butin, Der Forst und Holzwirt, nr. 12, 266 (1964).
8. H. Butin, Dtsch. Bot. Ges., **73**, 185 (1960).
9. H. Butin, V. Loeschcke, Naturwissenschaften, **47**, 451 (1960).
10. V. Loeschke, H. Butin, Mededel Landonwhogeschool, Gent, **26**, 1548 (1961).
11. H. Braun, C. Brendel, Naturwissenschaften, **48**, 286 (1962).
12. C. Brendel, Phytopath. Z., **53**, 1 (1965).
13. Rama Krishna Rao, E.R.B. K. Shanmugasundaram, Phytopathologische Zeitschrift, **57**, 183 (1966).
14. B. A. Rubin, E. V. Artsikhovskaya, *Biochemistry and physiology of immunity*, Pergamon Press, 1963.
15. I. Tănase, V. Mocanu, St. cerc. biochim., **11**, 413 (1968).
16. G. Magnani, 11 éme session FAO, Zagreb, 5 Sept. 1962, Comission du Peuplier.

SOME ASPECTS OF THE BARK BIOCHEMISTRY IN *POPULUS* × *EURAMERICANA* INFESTED BY *DOTHICHIZA POPULEA*

SUMMARY

The infestation with the fungus *Dothichiza populea* determines in the bark of *Populus* × *euramericana* (Dode) Guinier cv. '*Robusta* a disorder of the normal biochemical equilibrium at the level of free and bound aminoacids, of carbohydrates , chlorophyls and non-saturated fatty acids.

ST. CERC. BIOCHIM., 12, 1, 69–76 (1969)

SCINDAREA ENZIMATICĂ A IgG DE IEPURE DE CĂTRE FORMAȚIUNILE SUBCELULARE IZOLATE DIN SPLINA DE IEPURE ȘI DE ȘOBOLAN

CECILIA MOTAȘ și V. GHEȚIE

Rezumat. — Formațiunile intracelulare din splina de iepure și de șobolan s-au separat prin centrifugare fracționată la 900 g, 21 500 g și supernatant. Toate trei formațiunile prezintă activitate cateptică. IgG de iepure a fost hidrolizat *in vitro* cu aceste formațiuni, obținîndu-se fragmente Fab și Fc, puse în evidență prin cromatografiere pe Sephadex G-150, imunoelectroforeză și radioimunoelectroforeză. Rezultatele sînt discutate în legătură cu datele privind mecanismele de catabolizare ale anticorpilor omologi și eterologi.

Posibilitatea ca imunoglobulinele proprii sau cele străine să fie degradate, total sau parțial, la nivel subcelular este sugerată de trei categorii de fapte :

a) Albumina serică poate fi degradată, într-o măsură variabilă, de ficat și intestin *in vivo* [1], [2], felii de ficat și intestin [3], extracte totale de splină [4], [5], fracțiuni subcelulare din splină [6], ficat și creier [7] și de catepsinele purificate [8], [9], [10].

b) Serul normal de iepure și om conține anticorpi specifici față de grupările determinante, care se descoperă numai prin hidroliza enzimatică a IgG [11], [12]. Această constatare presupune că în cursul catabolizării IgG autologe apar fragmente similare cu cele produse de papaină sau pepsină.

c) Iepurii toleranți față de fragmentul Fc uman, cărora li se injectează IgG intactă, sînt capabili să elaboreze anticorpi numai față de fragmentul Fab [13]. Și acest fapt sugerează că la nivel celular are loc o hidroliză a IgG, similară cu cea produsă de papaină.

Lipsesc însă dovezile directe care să arate cum anume sînt degradate imunoglobulinele de către enzimele intracelulare și ce fel de fragmente rezultă în urma acțiunii acestora. Deși în prezent rezultatele hidrolizei cu papaină și pepsină au impus așa-numita structură „tripartită" a IgG [14] — două fragmente Fab și unul Fc —, lipsesc dovezile directe că aceste fragmente pot apărea în organism ca rezultat al acțiunii catepsinelor celulare și că nu sînt doar componente artificial obținute *in vitro*, cu scopul de a ușura cercetarea structurii imunoglobulinelor.

Lucrarea prezentă arată că imunoglobulina G de iepure este scindată identic de formaţiunile subcelulare bogate în lizozomi izolate din splina de iepure şi din cea de şobolan şi că fragmentele de hidroliză se aseamănă cu cele ce rezultă în urma acţiunii papainei la pH 5,5.

MATERIAL ŞI METODE

Separarea formaţiunilor subcelulare din splina de şobolan şi de iepure. S-a aplicat tehnica lui de Duve [15], utilizîndu-se zaharoză 0,25 M şi o centrifugare la 4°C. Formaţiunile separate la 920 g (10 min) şi 21 500 g (30 min) au fost suspendate în 1,0 ml, respectiv 0,5 ml tampon citrat 0,1 M, pH 3,5, pentru fiecare gram de splină omogenizat (greutate umedă).

Determinarea activităţii cateptice. Suspensiile formaţiunilor de 920 g şi 21 500 g, ca şi „supernatantul" (1 ml), s-au testat pentru activitatea proteolitică, folosind ca substrat hemoglobina denaturată, dizolvată în tampon citrat 0,1 M, pH 3,5 cu cisteină 0,07 M. După o oră, la 37°C, probele s-au precipitat cu acid tricloracetic 10% şi s-a citit extincţia la 280 mμ pentru $d = 0{,}5$ cm [16]. Pe o probă alicotă s-a determinat concentraţia proteică, utilizînd pentru suspensiile de 920 g şi 21 50g şi pentru omogenat metoda Aldridge [17],iar pentru „supernatant" metoda spectrofotometrică.

Digestia IgG şi Fc de iepure cu formaţiuni subcelulare. La 1 ml din suspensiile de 920 g şi 21 000 g sau din „supernatant" s-au adăugat 3 — 5 mg IgG sau Fc, dizolvate în 0,1 — 0,2 ml tampon citrat. S-a adăugat o picătură de toluen, apoi s-a incubat 16 ore la 37°C. În final s-a adus amestecul la pH 8,0 cu o soluţie de NaOH 0,5 N, s-a centrifugat la 5 000 g (15 min) şi s-a analizat supernatantul.

Depozitul a fost reluat în 1 ml tampon fosfat 0,1 M, pH 8,0, conţinînd 0,4% dezoxicolat de sodiu (DOC), şi s-a incubat încă 16 ore la 37°C. S-a centrifugat apoi la 5 000 g (15 min) şi s-a analizat supernatantul cu DOC.

S-au făcut şi digestii de IgG în prezenţa cisteinei 0,01 M şi, în cîteva cazuri, în supernatantele fără DOC s-a adăugat papaină (30 — 50 μg), iar amestecul s-a incubat încă 16 ore la 37°C.

Martorii s-au preparat în acelaşi fel, cu deosebirea că imediat după adăugarea IgG sau Fc s-a adus pH-ul amestecului la 8,0 cu o soluţie de NaOH 0,5 N.

Cromatografia pe Sephadex G-150. La 4 ml din suspensia formaţiunii de 21 000 g s-au adăugat 12 mg IgG marcată cu ^{131}I şi apoi s-a prelucrat conform indicaţiilor de mai sus. Supernatantele cu şi fără DOC s-au contopit, s-au dizolvat în ele 20 mg IgG şi 15 mg amestec Fab + Fc şi s-au dializat peste noapte faţă de o soluţie tampon Tris-HCl 0,2 M, pH 8,5. Dializatul s-a centrifugat, iar supernatantul s-a cromatografiat pe o coloană de Sephadex G-150, 90/2 cm, echilibrată şi eluată cu tamponul amintit mai înainte. Viteza de curgere a fost de 30 — 40 ml/oră şi s-au colectat fracţiuni de cîte 4 ml fiecare. Eluatele s-au spectrofotometrat la 280 mμ, iar radioactivitatea s-a măsurat cu un numărător cu cristal de TlI cu puţ.

Pentru referinţă s-au trecut peste aceeaşi coloană : a) un amestec de supernatante, cu şi fără DOC, însă la care nu s-a adăugat IgG (pentru

evidențierea proteinelor proprii formațiunilor), precum și b) fragmente Fab + Fc și IgG (incubat și neincubat 6 ore la 37°C într-o soluție de DOC 0,4%).

Radioiodurarea IgG. Marcarea iodului s-a făcut după tehnica oxidării cu azotit [18] în condiții în care se atașează aproximativ 2 atomi de iod/mol de IgG. Purificarea IgG radioactiv s-a făcut prin gel filtrare pe Sephadex G-25, echilibrat și eluat cu soluție salină fiziologică.

Determinarea radioactivității legate de formațiunea de 21 000 g. Cu un contor Geiger — Müller tip clopot, cu fereastră subțire, s-a măsurat radioactivitatea în supernatantele obținute prin extragerea depozitului rămas după prima centrifugare cu : a) tampon fosfat 0,1 M, pH 8,0 cu 0,4% DOC ; b) tampon fosfat 0,1 M, pH 8,0 fără DOC și c) tampon fosfat 0,1 M, pH 8,0 cu 0,4% DOC, însă după o extracție prealabilă cu tampon fosfat 0,1 M, pH 8,0. Procentul radioactivității eliberabile numai prin DOC s-a calculat din relațiile 100 c/a sau 100 (a — b)/a, obținîndu-se rezultate comparabile.

Analiza imunoelectroforetică și radioimunoelectroforetică. S-a aplicat tehnica lui Scheidegger [19], utilizîndu-se un gel de agaroză 1% în tampon barbital, pH 8,6, $\mu = 0{,}05$ (în cuvă) și 0,016 (în plăci). S-au aplicat un potențial de 6 — 8 V/cm, o intensitate de curent care n-a depășit 0,8 mA/cm și o durată de migrare de 90 — 120 min. Plăcile s-au prelucrat în modul obișnuit. Autoradiografiile executate pe film Fluorapid, Agfa, s-au developat după un contact de 2 săptămîni. Identificarea liniilor de precipitare s-a făcut prin tehnicile șanțului scurtat și șanțului suplimentar [20].

Antigene și antiseruri. IgG s-a preparat dintr-un amestec de seruri de iepure, utilizînd precipitarea cu $(NH_4)_2SO_4$ 33% și cromatografia pe DEAE-celuloză [21]. Fragmentul Fc s-a obținut prin cristalizare, după hidroliza IgG cu papaină la pH 7,0 [22]. Fragmentul Fab a fost obținut tot din acest hidrolizat, prin cromatografie pe CM-celuloză [23]; s-a luat primul pisc, care nu se fixează pe schimbător, și care conține fragmentul Fab.

Serul de oaie anti-Fc (care conține și anticorpi anti-Fab) l-am obținut prin bunăvoința dr. M. Waldesbühl de la Institutul de biochimie din Lausanne, serul de măgar anti-IgG l-am obținut prin bunăvoința dr. R. Nezlin de la Institutul de biologie moleculară din Moscova, iar serul de porc anti-Fab + Fc a fost obținut prin imunizarea unui animal cu un amestec de fragment Fab, redus cu β — mercaptoetanol și alchilat cu iodacetamidă și fragment Fc.

REZULTATE

Activitatea proteolitică a formațiunilor subcelulare izolate din splina de șobolan este cuprinsă în tabela 1.

Fracțiunea de 21 500 g, cu activitatea specifică cea mai ridicată, cuprinde mitocondriile grele și ușoare ale splenocitelor, bogate în lizozomi [24]. Ele n-au fost supuse unei fracționări mai avansate, printr-o centrifugare intermediară, deoarece experiențe preliminare (vezi și [8]) au arătat că fracțiunea de la 5 500 g are atît o activitate proteolitică, asemănătoare cu cea a fracțiunii de 21 500 g, cît și o acțiune similară asupra IgG.

Determinarea electroforetică a activității proteolitice a fracțiunii de 21 500 g a relevat prezența, la acest nivel, a catepsinei D,cu mobilitate electroforetică mică (vezi și [25]).

Incubarea IgG de iepure cu formațiunea de 21 500 g izolată din splina de șobolan, timp de 16 ore, la pH-ul optim de acțiuue al catepsinelor D (pH = 3,5) și analiza imunoelectroforetică a amestecului de reacție au furnizat o imagine care demonstrează scindarea imunoglobulinei (fig. 1).

Tabela 1

Activitatea proteolitică a omogenatului și a unor formațiuni subcelulare izolate din splina de șobolan

Fracțiunea	Cantitatea de proteine (mg/ml) *a*	Activitatea proteolitică ($E^{0,5}_{280um}$) *b*	Activitatea specifică (*b*/*a*)
Omogenat	17	0,58	0,034
940 g	43	0,78	0,018
21 500 g	33	1,47	0,045
Supernatant	13	0,33	0,025

Linia de precipitare notată Fab a fost identificată ca atare cu ajutorul unui preparat de Fab pur. Cele două linii așezate dedesubtul liniei Fab corespund fragmentului Fc, linia plasată mai spre anod (linia 1) fiind dată de un produs de scindare mai avansată a Fc (poate F'c), așa cum rezultă și din figura 2.

Linia 2 dn hidrolizat a fost găsită identică cu cea dată de Fc nehidrolizat (fuzionarea completă a liniilor de precipitare), ceea ce demonstrează că o parte din Fc desprins din molecula intactă a rămas neatacat. Totuși, în imunoelectroforegrama din figura 1, linia de precipitare 2 poate fi dată nu numai de fragmentul Fc, dar și de IgG nehidrolizată, care rămîne în amestec (vezi fig. 6) și care se situează în regiunea liniei de precipitare 2. Într-adevăr, adăugînd hidrolizatului neutralizat o cantitate suplimentară de IgG, se constată că linia de precipitare 2 devine mai intensă. Deci, în linia de precipitare 2 sînt cuprinse atît fragmentul Fc, cît și, poate, IgG rămasă nehidrolizată.

Efectuînd incubarea amestecului în prezența cisteinei (0,01 M) s-a constatat că linia de precipitare 2, corespunzătoare fragmentului Fc, și, poate, IgG nehidrolizată, dispare (fig. 3 *a*).

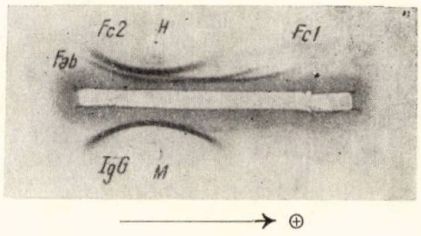
La adăugarea papainei a dispărut și linia 1 (F'c), semn că acest fragment a fost complet hidrolizat. În acest hidrolizat se evidențiază numai linia fragmentului Fab, singurul neatacat de papaină nici la pH acid [26].

Analiza imunoelectroforetică a extractului cu DOC obținut din formațiunea de 21 500 g arată că în interiorul formațiunii se găsesc aceiași produși de degradare ai IgG ca și în hidrolizat, cu deosebirea că raportul loc cantitativ este schimbat. Cu preparatul de IgC radioactivă s-a arătat că aproape 20% din radioactivitatea rămasă în formațiunea de 21 500 g nu poate fi eliberată decît dacă extractul conține DOC și că, în acest caz, în extracte se regăsește numai fragmentul Fc (linia 2 din fig. 1).

Incubînd IgC de iepure cu fracțiunile 920 g și „supernatant" (care alături de citoplasmă conține și fracțiunea microzomilor) provenite din splina de șobolan, s-au obținut rezultate similare celor prezentate mai sus.

Hidroliza IgG de iepure poate fi realizată și de către formațiunile subcelulare izolate din splina de iepure. Rezultatele au fost comparabile cu cele date de formațiunile provenite din splina de șobolan. Astfel, formațiunea de 21 500 g izolată din splina de iepure dă o imagine identică cu cea

Fig. 1. — Analiza imunoelectroforetică a amestecului de IgG cu formaţiunea de 21 500 g izolată din splina de şobolan. H = hidrolizat; M = martor; ser de oaie anti-Fc (+Fab).



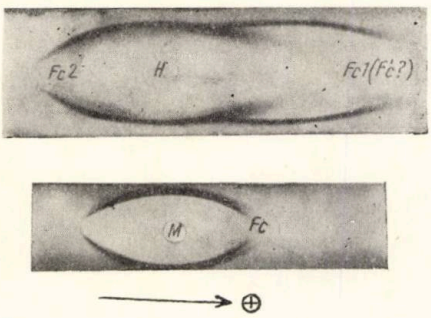


Fig. 2. — Analiza imunoelectroforetică a amestecului de Fc cu formaţiunea de 21 500 g izolată din splina de şobolan. H = hidrolizat; M = martor; ser de oaie anti-Fc (+Fab).

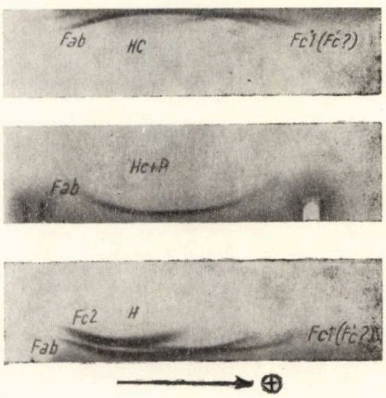


Fig. 3. — Analiza imunoelectroforetică a amestecului de IgG cu formaţiunea de 21 500 g izolată din splina de şobolan, în prezenţa cisteinei şi cu adaos suplimentar de papaină. HC = hidrolizat în prezenţa cisteinei; $HC + P$ = hidrolizat în prezenţa cisteinei şi apoi s-a adăugat papaină; H = hidrolizat fără cisteină; ser de oaie anti-Fc (+Fab).

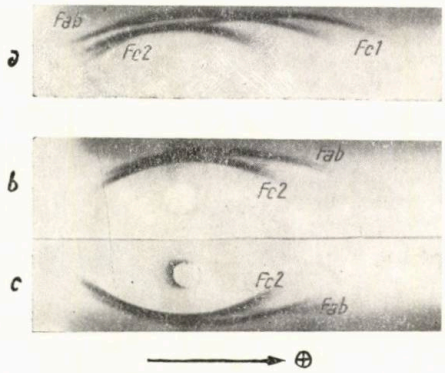


Fig. 4. — Analiza imunoelectroforetică a amestecurilor de IgG cu diferite formaţiuni subcelulare izolate din splina de iepure.
a. formaţiunea de 21 500 g; b. fracţiunea „supernatant"; c. formaţiunea de 920 g; ser de oaie anti-Fc (+Fab).

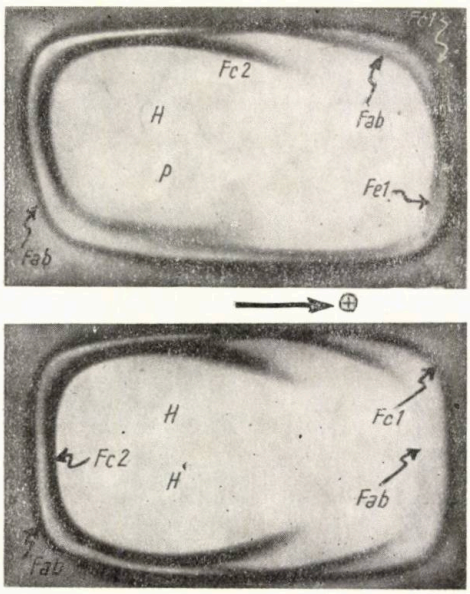


Fig. 5. — Imunoelectroforeza comparativă a hidrolizatului de IgG efectuat cu papaină la pH 5,5 (P) şi cu formaţiunea de 21 500 g (H). Ser de oaie anti-Fc (+Fab).

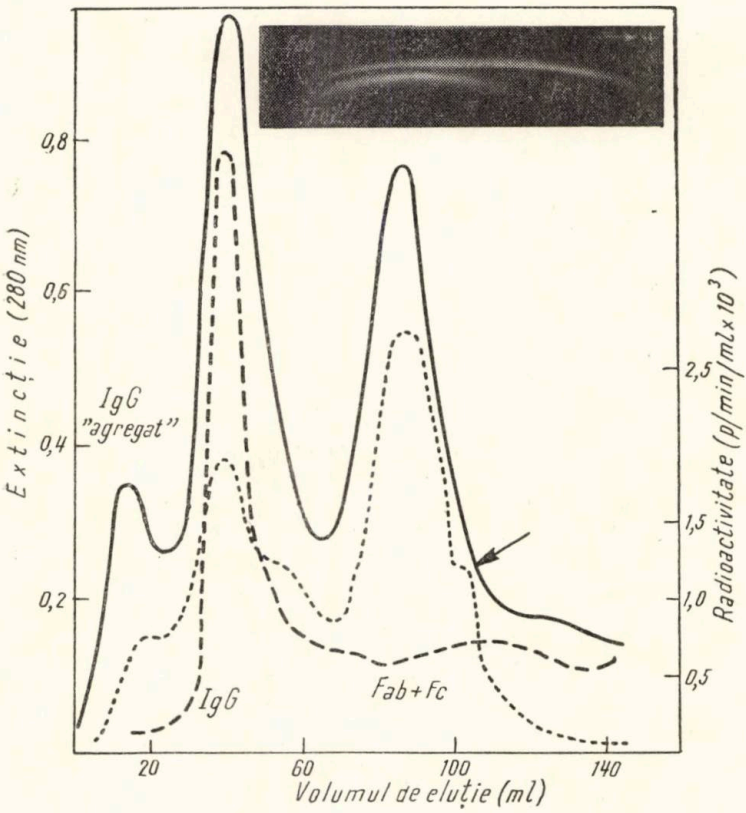


Fig. 6. — Diagrama de eluție a hidrolizatului de IgG radioactiv cu formațiunea de 21 500 g. În partea superioară a figurii s-a inserat și radioimunoelectroforeza hidrolizatului. ——— DO la 280 mμ; ..... radioactivitate; — — — fracțiunea de 21 500 g fără adaos de IgG. Denumirea piscurilor s-a făcut efectuîndu-se cromatograme de referință cu IgG și Fab + Fc; IgG „agregat" apare numai la incubarea proteinei cu DOC 0,4 %, 16 ore, la 37°C.

de şobolan (fig. 4), însă formaţiunile de 920 g şi „supernatantul" prezintă o imagine din care, de obicei, linia pentru F'c (linia 1 din fig. 1) lipseşte.

Felul cum IgG este hidrolizată de către formaţiunea de 21 500 g este foarte asemănător, dacă nu identic, cu cel în care acţionează asupra IgG papaina, însă nu la pH 7,0, ci la pH 5,5 (vezi şi [27]) (fig. 5).

Asemănarea dintre fragmentele produse prin hidroliza cu formaţiunea de 21 500 g şi fragmentele Fab şi Fc rezultate din hidroliza cu papaină s-a dovedit şi prin cromatografie pe Sephadex G—150. S-a analizat un hidrolizat de IgG radioactivă cu formaţiuni de 21 500 g, la care s-au adăudat IgG intactă şi un amestec de fragmente Fab şi Fc (fig. 6).

Deoarece atît Fab, cît şi cele două fragmente Fc sînt radioactive (vezi radioimunoelectroforeza din fig.6),suprapunerea celui de-al treilea pisc radioactiv cu piscul dat de amestecul Fab + Fc arată că fragmentele rezultate prin hidroliza IgG de iepure cu formaţiuni subcelulare de 21 500 g au o greutate moleculară asemănătoare cu acelea ale fragmentelor papainice Fab şi Fc. Inflexiunea din ramura ascendentă a ultimului pisc radioactiv (însemnată cu o săgeată) ar putea fi dată de existenţa în hidrolizatele cu formaţiunile de 21 500 g a fragmentului F'c (linia 1 din fig. 6), cu o greutate moleculară mai mică decît a fragmentelor Fab şi Fc [26].

Este de menţionat că în hidrolizat se păstrează o cantitate notabilă de IgG nehidrolizată, ceea ce dovedeşte că linia de precipitare 2 (din fig. 1) poate cuprinde nu numai Fc, ci şi IgG intactă. Fracţiunea radioactivă exclusă din gelul de Sephadex G—150 (GM >150 000) reprezintă, probabil, un agregat de IgG nehidrolizată, rezultat în urma acţiunii DOC-ului (vezi şi metode).

Rezultatele imunoelectroforetice prezentate în această lucrare au fost confruntate cu datele obţinute şi cu alte seruri imune, ca serul de măgar anti-IgG de iepure şi serul de porc anti-(Fab+Fc) de iepure, obţinîndu-se rezultate similare.

DISCUŢII

Scindarea IgG se realizează la nivelul formaţiunii de 21 500 g de către catepsina D, care pare a fi principala enzimă proteolitică a splenocitelor. Stefanovic şi colab. [25] au demonstrat că în celulele splenice de iepure catepsina E se găseşte doar în urme, aşa că efectul hidrolitic constatat poate fi pus pe seama activităţii catepsinei D.

Faptul că în hidrolizat se pot evidenţia pentru fragmentul Fc două linii de precipitare se poate explica printr-o dublă acţiune a catepsinelor: desfacerea fragmentului Fc din molecula intactă şi atacarea lui ulterioară. Fragmentul Fc cu mobilitate electroforetică mai mare (linia 1) ar putea fi similar cu fragmentul F'c obţinut prin acţiunea papainei asupra IgG de iepure la un pH sub 5,0 [26], [27].

Dispariţia liniei de precipitare Fc_2 cînd hidroliza se efectuează în prezenţa cisteinei 0,01 M arată că fragmentul Fc este susceptibil de a fi complet distrus de catepsine în prezenţa activatorului sulfhidrilic şi că o dată cu Fc se digeră şi IgG, care este „catepsin-rezistentă" în absenţa cisteinei. Această comportare aminteşte de „papain-rezistenţa" IgG de iepure [28], dar nu permite nici o speculaţie în această direcţie, atîta timp cît

nu se lucrează cu un preparat de catepsină D pur. În sfîrşit, dispariţia fragmentului F'c (care dă linia de precipitare 1) la adăugarea papainei peste amestec apare normală în lumina cercetărilor lui Prahl [26], care a arătat că fragmentul Fc poate fi complet hidrolizat de papaină la pH 3,5 utilizat în experienţa noastră.

Faptul că o parte din Fc rezultat din hidroliză se găseşte ferm legat de formaţiunea de 21 500 g şi nu este cedat decît dacă se utilizează un agent de desfacere drastic, ca DOC, apare ca o manifestare la acest nivel a binecunoscutei capacităţi a fragmentului Fc de a se fixa în unele ţesuturi [29].

Activitatea hidrolitică a fracţiunilor de 920 g şi „supernatant" poate fi pusă fie pe seama unei distribuţii mai largi a enzimei între formaţiunile subcelulare, fie, mai probabil, pe seama impurificării reciproce a fracţiunilor, centrifugările efectuînd doar *grosso modo* separarea formaţiunilor. Incapacitatea formaţiunilor de 920 g şi a „supernatantului" din splina de iepure de a hidroliza mai avansat fragmentul Fc nu trebuie căutată neapărat într-o particularitate calitativă a catepsinei din aceste formaţiuni, ci poate fi determinată de cantitatea insuficientă de enzimă adăugată, datorită faptului că în aceste formaţiuni activitatea proteolitică specifică este mai scăzută (vezi tabela 1).

Rezultatele noastre arată că în celulele de splină există catepsine capabile să hidrolizeze *in vitro* imunoglobulinele omologe şi eterologe, după un mecanism similar cu cel realizat de papaină.

Indiferent dacă sînt străine sau proprii, imunoglobulinele G pot fi hidrolizate la nivelul lizozomilor din splină în fragmente de tip Fab, Fc sau F'c. Acest lucru arată că structura „tripartită " a imunoglobulinelor prezintă o realitate biologică, fragmente Fab sau Fc putînd rezulta în organism ca urmare a unui proces normal de catabolizare a IgG autologe, metabolic uzate.

Rezultatele lui Spiegelberg şi Weigle [13], obţinute pe baza încheierii toleranţei la iepuri faţă de fragmentul Fc de om, cu IgG intactă, au sugerat autorilor ideea că IgG eterologă, intactă, este fragmentată *in vivo* înainte de a fi recunoscută ca străină. Această concluzie are un suport direct în rezultatele noastre experimentale. Faptul că IgG eterologă se scindează la fel ca cea omologă arată că, cel puţin în prima etapă, catabolizarea antigenelor are loc după un mecanism pe care celula-gazdă îl aplică proteinelor proprii.

Existenţa homoreactantului [11] [12] şi a antianticorpilor [30] este o consecinţă a faptului că hidroliza cateptică a imunoglobulinelor autologe pînă la nivelul unor fragmente Fab şi Fc este un fenomen fiziologic normal, care determină „dezvăluirea" pe Fab a unor grupări determinante ascunse în molecula intactă. Faptul că în serul de iepure s-au pus în evidenţă doi factori homoreactanţi diferiţi, unul capabil să reacţioneze cu Fab şi celălalt cu Fab' [12], arată că hidroliza cateptică ar putea da naştere la două feluri de fragmente Fab, ca rezultat al atacării lanţului H în puncte diferite. Această explicaţie este pertinentă cu constatarea că în cursul hidrolizei IgG de iepure cu papaină, la pH 5,5, se formează un fragment Fab cu o încărcare electropozitivă mai mare decît a Fab ce se obţine prin hidroliză la pH 7,0 [27].

Capacitatea formaţiunii de 21 500 g de a degrada mai departe fragmentul Fc şi incapacitatea ei de a scinda fragmentul Fab pot fi puse în

legătură cu constatarea că, într-o IgG eterologă, fragmentul Fab este mai slab antigenic decît fragmentul Fc [31]. Considerînd hidroliza mai avansată a fragmentului Fc eterolog ca o condiție a manifestării antigenicității, prin disocierea grupărilor determinante specifice pe peptide cu greutate moleculară mică (vezi și [32]), se poate înțelege de ce fragmentul Fab nehidrolizabil nu este decît slab antigenic.

Rolul anticorpilor capabili să se combine cu grupări determinante care se găsesc pe fragmentul Fab (sau Fab'), dar nu și pe molecula intactă, poate fi acela de factori care controlează *clearence*-ul acestui fragment. Fudenberg [33] consideră că anticorpii anti-Fab autolog pot lua naștere *in vivo* numai în anumite cazuri și că ei determină eliminarea acestui fragment care, provenind din anticorpi, ar putea avea un efect vătămător, mediind eliberarea substanțelor farmacologic active. Spre deosebire de acest autor, pe baza rezultatelor acestei lucrări, noi considerăm că anticorpii anti-Fab autolog iau naștere în mod obișnuit în organism (vezi și [34]) și că au rolul de a întîrzia eliminarea fragmentelor de Fab care, departe de a fi vătămătoare, sînt necesare organismului, care și le conservă cît mai mult timp prin acest mecanism. În sprijinul acestei idei pot fi aduse experiențele care au arătat că fragmentele Fab conservă activitatea biologică a moleculei intacte [14] și că eliminarea din circulație a fragmentului Fab este întîrziată prin combinarea lui cu antigenul corespondent [35], efect care ar putea fi produs și de fixarea de Fab a anticorpilor complementari pentru grupările determinante revelate pe acest fragment.

CONCLUZII

Formațiunile intracelulare de splină de iepure și de șobolan sînt capabile să hidrolizeze *in vitro* IgG de iepure după un mecanism asemănător cu cel al papainei.

Prezentată la redacție la 4 octombrie 1968

Institutul de biochimie al
Academia Republicii Socialiste România.
Sectorul de imunochimie

BIBLIOGRAFIE

1. V. Gheție, C. Medesan, N. St. Chisiu, St. cerc. biochim., **10**, 19 (1967).
2. V. Gheție, C. Medesan, N. St. Chisiu, Rev. roum. Biochim., **4**, 119 (1967).
3. J. Katz, A. L. Sellers, S. Golden, Proc. Soc. exp. Biol. Med., **103**, 807 (1960).
4. C. Lapresle, Ann. Inst. Pasteur, **89**, 654 (1955).
5. T. Ishizaka, D. H. Campbell, K. Ishizaka, Proc. Soc. exp. Biol. Med., **103**, 5 (1960).
6. C. Motaș, Rev. roum. Biochim., **5**, 135 (1968).
7. N. W. Penn, Biochim. biophys. Acta, **53**, 490 (1961).
8. E. M. Press, R. Porter, J. Cebra, Biochem. J., **74**, 501 (1960).
9. C. Lapresle, T. Webb, Biochem. J., **76**, 538 (1960).
10. C. Lapresle, T. Webb, Biochem. J., **84**, 455 (1962).
11. L. C. Kormeier, J. T. Ing, W. J. Mandy, J. Immunol., **100**, 612 (1968).
12. W. J. Mandy, J. Immunol., **99**, 815 (1967).
13. H. L. Spiegelberg, W. O. Weigle, J. Immunol., **98**, 100 (1967).
14. R. R. Porter, Brit. med. Bull., **19**, 197 (1963).

15. C. De Duve, B. C. Pressman, R. Gianetto, R. Wattiaux, F. Appelmans, Biochem. J., **60**, 604 (1955).
16. R. Gianetto, C. De Duve, Biochem. J., **59**, 433 (1955).
17. W. N. Aldridge, Biochem. J., **67**, 423 (1957).
18. A. Johnson, E. D. Pay, D. Pressman, J. Immunol., **84**, 253 (1960).
19. J. Scheidegger, Int. Arch. Allergy, **7**, 103 (1955).
20. V. Gheţie, V. Micuşan, *Analiza imunochimică*, Ed. Academiei, Bucureşti, p. 326–328.
21. J. L. Fahey, A. P. Horbett, J. biol. Chem., **234**, 2645 (1959).
22. J. L. Graff, F. Haurovitz, Immunochem., **1**, 31 (1964).
23. R. R. Porter, Biochem. J., **73**, 119 (1959).
24. W. E. Bowers, J. T. Finkenstaedt, C. De Duve, J. Cell Biol., **32**, 325 (1967).
25. J. Stefanovic, T. Webb, C. Lapresle, Ann. Inst. Pasteur, **103**, 276 (1962).
26. J. W. Prahl, Biochem. J., **104**, 647 (1967).
27. V. Gheţie, C. Motaş, S. Mihăescu, Rev. roum. Biochim., **6** (1969).
28. J. Gergely, D. R. Stanworth, R. Jefferis, D. E. Normansell, C. S. Henney, G. I.Pardoe, Immunochem., **4**, 101 (1967).
29. R. R. Porter, E. M. Press, Ann. Rev. Biochem., **31**, 625 (1962).
30. G. H. Gell, A. S. Kelus, Adv. Immunol., **6**, 461 (1967).
31. R. A. Bingghi, R. Oriol, Y. Boussac-Aron, Immunol., **13**, 63 (1967).
32. D. H. Campbell, J. S. Garvey, Adv. Immunol., **3**, 261 (1963).
33. H. H. Fudenberg, Clin. exp. Immunol., **2**, 1 (1967).
34. T. G. Lawrence, R. C. Williams, J. exp. Med., **125**, 233 (1967).
35. H. L. Spiegelberg, W. O. Weigle, Immunochem., **3**, 341 (1966).

ENZYMATIC SPLITTING OF RABBIT IgG BY SUB CELLULAR FRACTIONS ISOLATED FROM RABBIT AND RAT SPLEEN

SUMMARY

Sub-cellular fractions from rabbit and rat spleen were separated by fractional centrifugation at 900 g, 21500 g, and supernatant. All three fractions exhibit catheptic activity.

Rabbit IgG was digested by these fractions, in vitro, resulting in Fab and Fc fragments that were evidenced by chromatography on Sephadex G-150, immunoelectrophoresis and radioimmunoelectrophoresis.

Results are discussed in connection with the breakdown mechanisms of both homologous and heterologous antibodies.

ST. CERC. BIOCHIM., 12, 1, 77–82 (1969)

CONTRIBUȚII LA BIOSINTEZA CAROTINOIDELOR. IV. ASUPRA BIOSINTEZEI CAROTINOIDELOR DIN *AESCULUS HIPPOCASTANUM*

GAVRIL NEAMȚU, GHEORGHE ILLYES și CORNEL BODEA

Rezumat. — S-au determinat pigmenții carotinoidici din frunze, muguri florali și flori de *Aesculus hippocastanum*. Dintre elementele florale, în anterele cu polen s-au identificat un număr mare de carotinoide, în special ceto-hidroxi-carotinoide. Pigmentul principal este capsantina, alături de care s-au identificat capsorubina, capsantona, capsantinmonoepoxidul, zeaxantina și β-carotina. Din rezultatele obținute cu privire la dinamica biosintezei pigmenților carotinoidici la această specie reiese că principalele ceto-hidroxi-carotinoide iau naștere în țesuturile care formează anterele și polenul din mugurii florali.

Speciile din genul *Aesculus*, cu toate că au un areal mare de răspîndire, fiind cultivate în multe țări, în parcuri și grădini publice, ca plante lemnoase ornamentale, nu au fost cercetate pînă în prezent sub aspectul pigmenților carotinoidici. Aceasta se datorește, probabil, faptului că florile au petale de culoare albă sau roșiatică, care sînt sărace în carotinoide.

Dintre cele 18 specii ale acestui gen, cea mai răspîndită în țara noastră este *Aesculus hippocastanum*, un copac înalt, de aproximativ 20 m, cu petale de culoare albă. Polenul are însă culoarea portocalie-roșiatică, caracteristică ceto-carotinoidelor, fapt ce ne-a determinat să cercetăm pigmenții carotinoidici din această specie. Pînă în prezent se cunosc relativ puține plante care să conțină ceto-carotinoide în polen [1], [2], [3], [4].

În prezenta lucrare s-au urmărit determinarea pigmenților carotinoidici din frunzele, mugurii florali și florile de *Aesculus hippocastanum*, precum și cunoașterea proceselor de biosinteză a carotinoidelor din polen.

MATERIAL ȘI METODE

Pentru determinarea pigmenților carotinoidici s-a folosit material proaspăt recoltat în perioada 20.IV—15.V în anii 1967 și 1968 de pe arbori de *Aesculus hippocastanum* de la Institutul agronomic din Cluj.

Pentru determinările cantitative s-au folosit 150 g de frunze, 100 g petale, 300 g muguri florali și 80 g antere cu polen.

Extragerea pigmenților carotinoidici s-a făcut cu amestec de eter de petrol-acetonă-metanol 6 : 3 : 1, iar developarea coloanelor adsorbante cu amestec de eter de petrol și benzen pînă la 85%.

Pentru separarea și purificarea carotinoidelor s-a folosit, în cea mai mare parte, cromatografia pe coloană (45 × 5 cm), utilizîndu-se ca adsorbant un amestec de MgO : nisip fin, în raport de 1 : 2 în greutate. Pentru verificarea purității pigmenților și pentru cromatograme de amestec s-a folosit și cromatografia în strat subțire, utilizîndu-se ca adsorbant MgO, iar ca developant amestecul de etanol-cloroform-neofalină 1 : 2 : 7.

Cromatogramele de amestec s-au făcut cu pigmenți carotinoidici naturali, obținuți din *Capsicum annuum* (fructe roșii și boia).

Identificarea și determinarea pigmenților carotinoidici s-au făcut prin aceleași metode ca în lucrările anterioare [5], [6].

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Determinarea cantitativă a pigmenților carotinoidici din frunzele în creștere este trecută în tabela 1.

Tabela 1

Determinarea carotinoidelor foliare din *Aesculus hippocastanum* în mg/100 g frunze proaspete

Carotinoide	Frunze de :				
	1 zi	3 zile	6 zile	15 zile	25 zile
α-Carotina	0,08	0,12	0,12	0,14	0,18
β-Carotina	0,55	0,75	0,80	0,84	0,95
Criptoxantina	0,06	0,09	0,10	0,12	0,16
Luteina	1,50	1,25	1,15	1,00	1,00
Zeaxantina	0,02	urme	—	—	—
Violaxantina	0,60	0,55	0,52	0,40	0,30
Pigmenți chinonici	2,40	2,20	1,80	1,50	1,40

În frunzele de *Aesculus hippocastanum*, pe lîngă carotinoidele foliare comune, se constată ca un aspect caracteristic prezența unor pigmenți chinonici [7], de culoare galbenă, puternic reținuți pe coloana adsorbantă.

Culoarea verde-gălbuie a frunzelor tinere, față de cea verde închis a frunzelor mature, se datorește existenței în cantitate mai mare a luteinei, violaxantinei și pigmenților chinonici. În timpul creșterii frunzelor se observă o ușoară creștere a α-carotinei, β-carotinei și criptoxantinei, în timp ce restul pigmenților scad sub aspect cantitativ.

În perișorii de culoare brună-roșiatică ce acoperă frunzele tinere s-au pus în evidență cantaxantina, luteina și β-carotina.

Concomitent cu frunzele cresc și mugurii florali, care sînt dispuși în inflorescențe piramidale. Pentru a putea urmări procesele de biosinteză și corelația dintre carotinoide, s-au determinat pigmenții carotinoidici și din mugurii florali în diferite faze de creștere (tabela 2).

În mugurii florali nedezvoltați s-au pus în evidență atît carotinoidele care se găsesc în frunze (α-carotina, β-carotina, criptoxantina, luteina, violaxantina), cît și capsantina, care reprezintă pigmentul principal din polen. În timpul creșterii și dezvoltării mugurilor florali se observă o micșorare a carotinoidelor foliare și a pigmenților chinonici, dar o creștere a capsantinei, capsorubinei și monoepoxidului de capsantină.

Tabela 2

Determinarea carotinoidelor din mugurii florali de *Aesculus hippocastanum* în mg/100 g muguri proaspeți

Carotinoide	Muguri nedezvoltați de 1—2 zile	Muguri dezvoltați de 5—6 zile	Muguri înainte de înflorire de 10—12 zile
α-Carotina	0,08	0,12	0,04
β-Carotina	1,35	1,10	0,74
Criptoxantina	0,20	urme	—
Zeaxantina	0,16	0,14	0,10
Capsantina	0,30	0,80	1,30
Capsantinmonoepoxidul	—	0,07	0,16
Capsorubina	—	urme	0,25
Luteina	1,50	1,15	0,90
Violaxantina	0,50	0,30	0,10
Pigmenți chinonici	1,60	1,25	0,70

Din această corelație se poate presupune că capsantina se formează din celelalte carotinoide identificate în mugurii florali, conform schemei 1.

Pentru a putea cunoaște în care anume elemente florale se formează principalele ceto-hidroxi-carotinoide, s-au identificat prin cromatografia în strat subțire pigmenții carotinoidici separat din sepale, petale, stamine și pistil.

În sepale s-au identificat β-carotina, luteina, zeaxantina și violaxantina. Cantitatea de zeaxantină și violaxantină, apreciată după lățimea zonei, este mai mare decît în frunzele tinere.

Petalele tinere au o culoare albă, iar la baza petalei, spre interior, ele au o pată galbenă. În timpul creșterii și dezvoltării florii, pata galbenă devine cafenie și, în final, roșie.

În petalele cu pete galbene s-au identificat β-carotina, luteina și pigmenți chinonici. În petalele cu pete roșii s-au identificat β-carotina, luteina, pigmenți chinonici, antociani și urme dintr-o ceto-carotinoidă neidentificată.

Culoarea galbenă a petelor din petale trece în roșu în timp de 1—4 zile de la înflorire și această schimbare se datorește în primul rînd formării antocianilor și mai puțin pigmenților carotinoidici cetonici.

În filamentele staminelor și în pistil se găsesc în cantitate mai mare pigmenți chinonici și urme din principalele carotinoide ale polenului (capsantină, capsorubină).

Partea cea mai bogată în carotinoide o constituie la această specie anterele cu polen (tabela 3).

Cromatograma pigmenților carotinoidici din anterele cu polen, de culoare portocalie-roșiatică, se prezintă în tabela 3.

Din cromatogramă se observă că în anterele cu polen de culoare portocalie-roșiatică se găsesc un mare număr de pigmenți carotinoidici, în special ceto-hidroxi-carotinoide de tipul celor care se găsesc și în *Capsicum annum* [8], [9], cu toate că între aceste specii nu există o înrudire filogenetică. Pigmentul principal este capsantina, alături de care s-au identificat capsorubina și unele ceto-hidroxi-carotinoide mai rar întîlnite în natură, ca, de exemplu, capsantona și capsantinmonoepoxidul. În cromatogramă apar și unele ceto-carotinoide neidentificate (culoare roșie-violacee) din cauza

Tabela 3

Cromatograma carotinoidelor din antere cu polen de *Aesculus hippocastanum*

Lățimea zonei cm	Culoarea	Carotinoide	Maximele de absorbție în eter de petrol nm	mg/100 g antere cu polen proaspăt
2,0	galben-portocaliu	neidentificat		
0,6	galben	neidentificat		
1,6	violet	capsorubină ester	502, 475	2,20
1,00	interzonă			
1,0	violet	capsantonă ester	502, 474	1,50
0,3	roșu-violet	neidentificat		
0,6	roșu-cărămiziu	capsantinmonoepoxid ester	500, 468, 448	0,80
0,8	interzonă			
2,5	roșu-violaceu	capsantină ester	498, 468, 447	4,50
0,4	roșu-violaceu	neidentificat		
0,5	portocaliu-cărămiziu	zeaxantină ester	478, 448	0,25
1,0	interzonă			
1,0	portocaliu	β-carotină	480, 450	0,60

cantității lor reduse. Dintre carotinoidele comune se găsește zeaxantina și β-carotina.

În polen nu s-au identificat carotinoide cu structură α-iononică.

Din analiza pigmenților carotinoidici pe elemente florale reiese că ceto-hidroxi-carotinoidele din mugurii florali provin din țesuturile care formează anterele și polenul.

Polenul din mugurii florali dezvoltați, dar nedeschiși, are o culoare cafenie și este mai sărac în carotinoide. Dintre ceto-hidroxi-carotinoide s-au identificat numai capsantina, capsorubina și capsantinmonoepoxidul. După deschiderea mugurilor florali, culoarea polenului devine treptat portocalie-roșiatică. În acest timp are loc biosinteza accentuată a ceto-carotinoidelor, stimulată probabil de lumină.

Ceto-hidroxi-carotinoidele din anterele cu polen de culoare portocalie-roșiatică de *Aesculus hippocastanum* sînt cu mult mai numeroase decît ceto-hidroxi-carotinoidele identificate în polenul altor plante [2], [3].

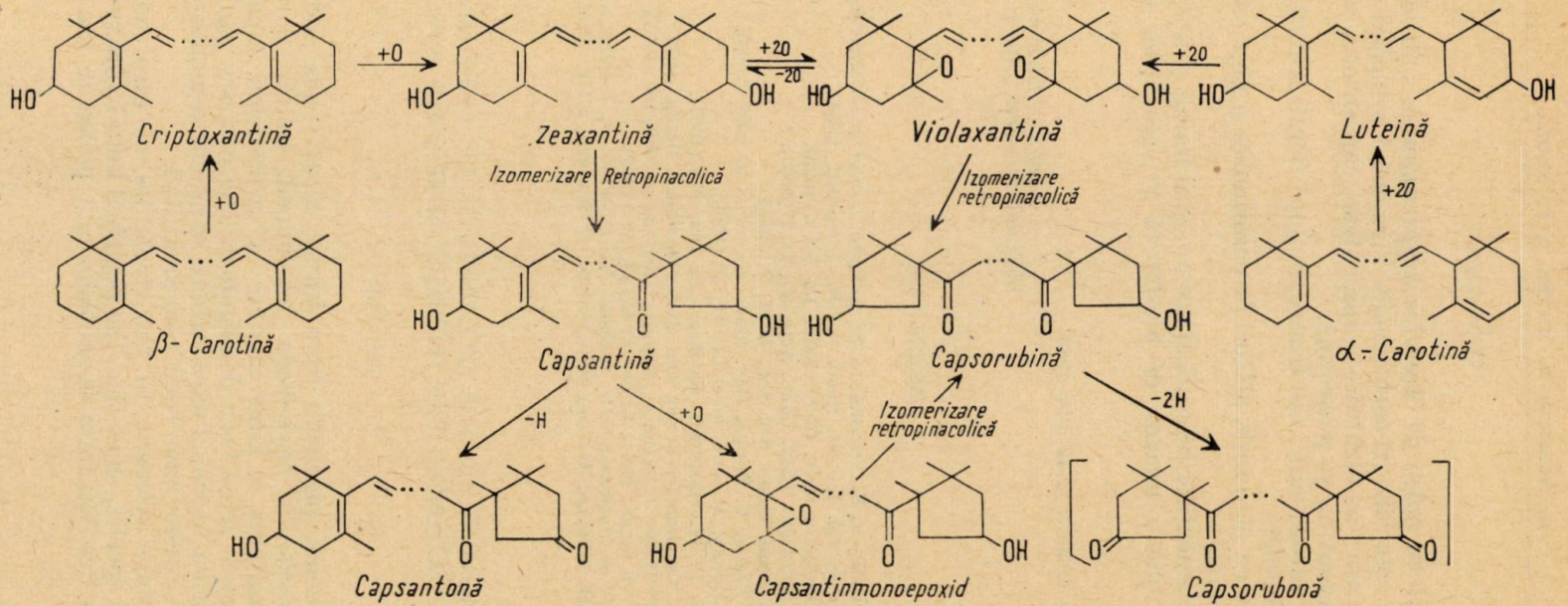
Pigmenții carotinoidici din polen se pot forma atît din carotinoidele existente în celelalte părți ale plantei (frunze, petale, sepale, filamente staminale etc.), cît și din precursori inferiori.

Ținînd seama de pigmenții carotinoidici identificați în mugurii florali și de interconversiunea lor, propunem o schemă probabilă de biosinteză a carotinoidelor din polen.

Capsantina și celelalte ceto-hidroxi-carotinoide care au în moleculă inele cu 5 atomi de carbon se pot forma din carotinoide cu inele β-iononice (care au 6 atomi de carbon), printr-o transpoziție retropinacolică [10]—[12].

În procesul de biosinteză a capsantinei din zeaxantină poate să apară ca produs intermediar anteraxantina, iar în procesul de transformare a luteinei în violaxantină, eloxantina.

Ceto-carotinoidele neidentificate din polen fac parte, probabil, dintre carotiñoidele ce au în moleculă inele cu 5 atomi de carbon. Ele pot să constituie fie produși intermediari în sinteza carotinoidelor identificate, fie produșii lor de oxidare sau reducere.



Schema biosintezei pigmenţilor carotinoidici din polen de *Aesculus hippocastanum*

CONCLUZII

În anterele cu polen de *Aesculus hippocastanum* s-au identificat un număr mare de ceto-hidroxi-carotinoide. Pigmentul principal este capsantina, alături de care s-au identificat capsorubina, capsantona, capsantinmonoepoxidul, zeaxantina și β-carotina.

Pigmenții carotinoidici din frunze, muguri florali și flori sînt însoțiți de pigmenți chinonici.

În petalele cu pete roșii, alături de carotinoide și pigmenți chinonici, se găsesc și antociani.

Pe baza pigmenților identificați în mugurii florali și a interconversiunii lor, s-a propus o schemă de biosinteză a pigmenților carotinoidici din polen.

Prezentată la redacție la 12 iulie 1968

Catedra de biochimie,
Institutul agronomic „Dr. P. Groza",
Cluj

BIBLIOGRAFIE

1. C. Bodea, V. Fărcășan, E. Nicoară, H. Slușanschi, *Tratat de biochimie vegetală, Partea I. Fitochimie*, vol. I, Edit. Acad. R.P.R., București, 1964.
2. P. Karrer, A. Oswald, Helv. Chim. Acta, **18**, 1303 (1935).
3. P. Karrer, E. Leumann, Helv. Chim. Acta, **34**, 1412 (1951).
4. A. Sykut, Bull. Acad. Polon. Sci. Ser., **XIII**, 5 (1965).
5. G. Neamțu, V. Tămaș, C. Bodea, Rev. roum. Biochim., **3**, 1305 (1966).
6. G. Neamțu, C. Bodea, St. cerc. biochim., **11**, 39 (1968).
7. A. R. Welburn, F. W. Hemming, Biochem. J., **104**, 173 (1967).
8. L. Zechmeister, *Carotinoide*, Verlag von Julius Springer, Berlin, 1934.
9. L. Cholnoky, D. Szabo, J. Szabolcs, Liebigs. Ann. Chem., **606**, 194 (1957).
10. R. Entschel, P. Karrer, Helv. Chim. Acta, **43**, 89 (1960).
11. M. S. Barber, L. M. Jackman, C. K. Warren, B.C.L. Weedon, J. chem. Soc., 4019 (1961).
12. J. W. Faigle, H. Müller, W. von Philipsborn, P. Karrer, Helv. Chim. Acta, **47**, 741 (1964).

CONTRIBUTIONS TO THE BIOSYNTHESIS OF CAROTENOIDS. IV. ON THE CAROTENOID BIOSYNTHESIS IN *AESCULUS HIPPOCASTANUM*

SUMMARY

The carotenoid pigments from leaves, floral buds and flowers of *Aesculus hippocastanum* have been determined. In the floral elements bearing pollen anthers, a large number of carotenoids, especially keto-hydroxy-carotenoids have been determined. The primary pigment is capsanthin, in addition to which capsorubine, capsanthin-monoepoxide, zeaxanthin and β-carotene have been also identified.

These findings relevant to the dynamics of carotenoid pigment synthesis in this species, show that the principal keto-hydroxy-carotenoids arise in those tissues that form the anthers and pollen in the floral buds as well.

ST. CERC. BIOCHIM. 12, 1, 83–90 (1969)

MODIFICĂRI CANTITATIVE ALE UNOR MONOZAHARIDE TISULARE SUB INFLUENȚA HISTAMINEI, TPP ȘI PIRUVATULUI DE SODIU

T. RUSĂNESCU, A. CURIGUȚ și I. KIȚULESCU

Rezumat. — Au fost studiate modificările cantitative ale următoarelor monozaharide: hexozamina, metilpentoze, acizi uronici, hexoze neutre totaleși glucidele totale la șobolanii normali și canceroși, sub acțiunea histaminei, tiaminpirofosfatului și piruvatului de sodiu. Cercetările s-au efectuat pe omogenate hepatice și cerebrale totale. Rezultatele obținute au indicat, pe de o parte, posibilitățile de influențare a metabolismului glucidic de către aceste substanțe, iar pe de altă parte capacitatea de răspuns diferită a șobolanilor normali și a celor canceroși, puși în aceleași condiții experimentale.

Modificările metabolismului glucidic și transformările glucozei în celula canceroasă sînt mult studiate. Cu ajutorul marcajului radioactiv [8] au fost cercetate transformările glucozei în monozaharidele necesare biosintezei polimerilor glucidici, omogeni sau eterogeni, și s-au stabilit căi de transformare a glucozei prin epimerizare, conversiune, dehidrogenare sau oxidare.

Activarea acestor monozaharide se realizează prin legarea lor la nucleotide specifice fiecăruia, ca, de exemplu, ADP-glucoză, UDP-galactoză, GDP-manoză, CMP-acid neuraminic. La rîndul lor, aceste nucleotide glucidice cedează monozaharidele legate de ele complexelor glicoproteice (glicoproteine și mucopolizaharide) sau direct lanțului proteic acceptor, eliberat de ribozomi în vederea formării complexelor glicoproteice, a proteinelor de excreție.

Presupunînd absența rolului specific al glucidelor, logic ar fi ca ele să dea proteinelor un caracter general; în acord cu această supoziție, s-a constatat că cele mai multe proteine de excreție sînt glicoproteine, în timp ce proteinele celulare nu sînt cuplate cu glucidele. Astfel, rolul părții glucidice a polimerilor glicoproteici ar fi de a transporta proteinele dincolo de membrana celulară [9].

În această lucrare s-au studiat modificările cantitative ale unor monozaharide în ficatul și creierul șobolanilor Wistar, sub influența unor mediatori chimici ai activității nervoase, histamina și tiaminpirofosfatul (TPP), care au determinat modificări însemnate și în ritmul biosintezei proteice.

Această constatare a reieșit dintr-o lucrare anterioară [10], în care s-au studiat modificările suferite de biosinteza proteică și glicopro-

teică, în condiţii experimentale asemănătoare celor din prezenta investigaţie, la şobolani normali şi grefaţi cu tumoră Jensen [10]. Faţă de aceeiaşi mediatori chimici, s-au constatat capacităţi de reactivitate diferită la animalele canceroase în comparaţie cu cele normale, oglindite în modificările cantitative proteice şi glicoproteice, hepatice şi cerebrale.

Monozaharidele studiate în această lucrare sînt: hexozamina, acizii hexuronici, metilpentozele, hexozele neutre totale şi glucidele totale din creierul şi ficatul şobolanilor normali sau purtători de tumoră Jensen.

MATERIAL ŞI METODĂ

Pentru studierea modificărilor cantitative ale acestor monozaharide s-au folosit trei variante experimentale:

lot I: acţiunea histaminei (H) (1 mg/animal/doză unică i.p.);

lot II: acţiunea tiaminpirofosfatului (2 mg) şi piruvatului de Na (20 mg/animal/doză unică i.p.);

lot III: efectul asocierii histaminei (1 mg), tiaminpirofosfatului (2 mg) şi piruvatului (20 mg/animal/doză unică i.p.).

După injectarea mediatorilor, variaţiile monozaharidelor au fost cercetate la următoarele intervale de timp: 2, 24, 48, 72 şi 96 de ore.

Rezultatele s-au comparat cu valorile acestor monozaharide în ficatul şi creierul unor animale normale sau purtătoare de tumoră Jensen, de aceeaşi vîrstă şi hrănite în acelaşi fel, dar neinjectate.

Fiecare lot experimental a cuprins 50 de şobolani, sacrificîndu-se cîte 10 şobolani la fiecare din intervalele de timp menţionate.

S-a lucrat pe omogenate hepatice şi cerebrale totale, la care extragerea lipidelor s-a realizat cu acetonă şi cloroform-metanol 2 :1 [1], [2].

Pentru determinările cantitative ale monozaharidelor în omogenatele delipidate s-au folosit următoarele metode: glucide totale — metoda Dubois; hexoze neutre legate — metoda Winzler [4]; acizii hexuronici — metoda Dische [5]; metilpentoze — metoda cisteinei-acid sulfuric [6]; hexozamine — metoda Elson-Morgan [7].

Exprimarea rezultatelor s-a făcut în mg la 100 g ţesut uscat.

REZULTATE

Cele mai mari variaţii cantitative determinate de mediatori s-au obţinut în glucidele totale din ficatul şi creierul şobolanilor normali. Tiaminpirofosfatul determină în mod constant efecte puternice asupra monozaharidelor studiate, în sensul creşterii acestora în ficatul şobolanilor normali, cu excepţia acizilor hexuronici, care în toate probele şi la toate intervalele de timp studiate au fost găsiţi sub nivelul grupului martor.

Variaţiile cantitative zilnice sînt redate în valori absolute şi relative în tabelele 1—6. Hexozaminele au crescut în ficatul normal, în general, la toate trei loturile.

Metilpentozele au înregistrat cele mai mari creşteri în ficatul normal la lotul acţiunii asociate (Hist + TPP + piruvat de Na).

Hexozele neutre legate în ficatul şobolanilor normali sînt cele mai crescute în lotul II (TPP).

Glucidele au înregistrat creşteri foarte mari în toate cele trei loturi, atît în creier, cît şi în ficat.

Acizii hexuronici au făcut excepţie comparativ cu celelalte monozaharide studiate, înregistrînd scăderi, în toate loturile, atît în creierul, cît şi în ficatul animalelor normale şi al celor purtătoare de tumori.

Capacitatea de a răspunde la acţiunea agenţilor studiaţi a fost foarte deosebită la ficatul şobolanilor normali faţă de ficatul şobolanilor canceroşi. Astfel, în timp ce în ficatul normal, s-au obţinut creşteri mari cantitative ale hexozaminelor pentru toate trei loturile, în ficatul şobolanilor canceroşi s-au observat scăderi la toate trei loturile.

De asemenea, glucidele totale au crescut în ficatul şobolanilor normali, în timp ce în ficatul şobolanilor canceroşi s-au constatat scăderi.

În acelaşi sens se prezintă şi rezultatele obţinute pentru metilpentoze.

Hexozele neutre legate sînt singurele monozaharide la care deosebirile dintre ţesutul normal şi cel canceros nu sînt atît de mari.

În creierul normal, toate monozaharidele studiate, cu excepţia glucidelor totale, au fost în general scăzute în raport cu valorile martorilor.

În creierul canceros, rezultatele obţinute sînt mai puţin constante; de exemplu, metilpentozele au crescut la toate trei loturile, pe cînd hexozele neutre au scăzut la toate trei loturile.

DISCUŢII

Creşterile foarte mari ale glucidelor în ficat (peste 100%) sînt în acord cu cele stabilite de alţi autori, care au demonstrat că ficatul este locul celei mai intense biosinteze glicoproteice [13], [14]. În lucrările noastre anterioare am constatat de asemenea că histamina şi tiaminpirofosfatul determină creşteri foarte mari ale glicoproteinelor serice la şobolanii normali şi variaţii cantitative mari ale proteinelor în ficatul şobolanilor normali şi al celor canceroşi [15].

Creşterile foarte mari ale glucidelor totale din creierul normal, mai ales la loturile tratate cu tiaminpirofosfat şi piruvat de sodiu, ar putea fi explicate prin intensificarea oxidărilor iniţiate de decarboxilarea oxidativă a acidului piruvic, determinată de TPP, care, datorită funcţiei sale de cofactor al carboxilazelor, activează ciclul acizilor tricarboxilici.

În deosebirea dintre rezultatele obţinute pentru hexozele neutre la lotul I (histamină) şi lotul II (TPP) se reflectă importanţa tiaminpirofosfatului pentru metabolismul glucidic. Aceste rezultate, amplificate la nivelul hexozaminelor, metilpentozelor şi glucidelor totale, demonstrează rolul regulator al hexozelor neutre în biosinteza polimerilor glucidici.

Scăderile acizilor hexuronici, înregistrate în mod constant la toate loturile atît în ficat, cît şi în creier, se pot explica prin consumul lor în procesul de glucuronoconjugare, care s-a manifestat mai ales la animalele normale, cu funcţionalitate celulară hepatică nealterată.

Variaţiile, în general mult mai mici, ale monozaharidelor din creier şi, mai ales, inhibiţiile de biosinteză constatate în creierul şobolanilor nor-

Tabela 1

Modificări cantitative ale hexozaminelor din ficatul şobolanilor normali şi purtători de tumoră Jensen sub influenţa histaminei, TPP şi piruvatului de sodiu

mg/100 g ţesut uscat

Timp	Lot I — histamină				Lot II — TPP + piruvat de Na				Lot III — acţiune asociată			
	normal		canceros		normal		canceros		normal		canceros	
	val. absol.	val. relat.	val. absol.	val. relat.	val. absol.	val. relat.	val. absol.	val. relat.	val. absol.	val. relat.	val. absol.	val. relat.
Martor	2 100	100	4 325	100	2 100	100	4 325	100	2 100	100	4 325	100
2 ore	5 172	246	4 452	102,9	3 572	170	2 459	55,9	2 979	141	3 236	75,4
24 ore	5 131	244	4 194	96,9	2 689	128	636	14,7	3 227	153	3 526	81,5
48 ore	2 979	141	3 731	86,2	5 000	238	939	21,7	4 758	226	3 726	81,6
72 ore	2 482	118	4 579	105,8	4 758	226	2 132	492	2 068	98,4	1 865	43,1
96 ore	1 655	78,8	1 484	34,3	2 151	102	1 272	29,4	4 221	201	1 350	30,9

Lot I — animale injectate cu histamină 1 mg/animal/ doză unică i.p.; Lot II — animale injectate cu TPP 2 mg şi piruvat de sodiu 20 mg/animal/doză unică i.p.; Lot III animale injectate cu histamină 1 mg, TPP 2 mg şi piruvat de sodiu 20 mg/animal/doză unică i. p.

Valorile absolute reprezintă medii ale rezultatelor obţinute pe grupe de cîte 10 şobolani.

Tabela 2

Modificări cantitative ale metilpentozelor din ficatul şobolanilor normali şi purtători de tumoră Jensen, sub influenţa histaminei, TPP şi piruvatului de sodiu

mg/100 g ţesut uscat

Timp	Lot I — histamină				Lot II—TPP+Piruvat de Na				Lot III—acţiune asociată			
	normal		canceros		normal		canceros		normal		canceros	
	val. absol.	val. relat.	val. absol.	val. relat.	val. absol.	val, relat.	val. absol.	val. relat.	val. absol.	val. relat.	val. absol.	val. relat.
Martor	67	100	135	100	67	100	135	100	67	100	135	100
2 ore	64	95,5	96	71,1	60	89	339	251	233	347	50	37
24 ore	99	147,7	181	81,4	171	255	139	102,9	86	128,3	118	87,4
48 ore	59	88	95	70,3	56	83,6	58	42,9	76	113	26	19,2
72 ore	82	122	70	51,8	80	119	120	88,9	71	105,9	161	119
96 ore	—	—	107	79	66	98,5	102	75,5	156	232,9	81	52,6

Lot I — animale injectate cu histamină 1 mg/animal/ doză unică i.p.; Lot II — animale injectate cu TPP 2 mg şi piruvat de sodiu 20 mg/animal/doză; unică i.p.; Lot III — animale injectate cu histamină 1 mg, TPP 2mg şi piruvat de sodiu 20 mg/animal/doză unică.

Valorile absolute reprezintă medii ale rezultatelor obţinute pe grupe de cîte 10 şobolani.

Tabela 3

Modificări cantitative ale hexozelor neutre totale din ficatul şobolanilor normali şi purtători de tumoră Jensen, sub influenţa histaminei, TPP şi piruvatului de sodiu

mg/100 g ţesut uscat

Timp	Lot I — histamină				Lot II — TPP + piruvat de Na				Lot III — acţiune asociată			
	normal		canceros		normal		canceros		normal		canceros	
	val. absol.	val. relat.	val. absol.	val. relat.	val. absol.	val. relat.	val. absol.	val. relat.	val. absol.	val. relat.	val. absol.	val. relat.
Martor	1 051,7	100	1 987	100	1 051,7	100	1 987	100	1 051,7	100	1 987	100
2 ore	1 051,7	100	1 554	77,7	1 689	160	2 210	111	2 586	246	1 896	95,4
24 ore	1 244	118	1 912	96,2	1 948	185	1 546	77,3	1 775	168,8	2 190	110
48 ore	—	—	1 749	88	1 086	103	1 988	100	1 344	128	3 621	182
72 ore	1 482	141	1 996	102	2 344	223	2 848	143	1 172	111	1 554	77,7
96 ore	1 437	136	1 286	64,7	2 310	219	3 356	168	1 413	134	3 038	152

Lot I — animale injectate cu histamină 1 mg/animal/ doză unică i.p.; Lot II — animale injectate cu TPP 2 mg şi piruvat de sodiu 20 mg/animal/ doză unică i.p.; Lot III — animale injectate cu histamină 1 mg, TPP 2 mg şi piruvat de sodiu 20 mg/animal/doză unică i.p.
Valorile absolute reprezintă medii ale rezultatelor obţinute pe grupe de cîte 10 şobolani.

Tabela 4

Modificări cantitative ale glucidelor totale în creierul şobolanilor normali şi purtători de tumoră Jensen, sub influenţa histaminei, TPP şi piruvatului de sodiu

mg/100 g ţesut uscat.

Timp	Lot I — histamină				Lot II — TPP + piruvat de Na				Lot III — acţiune asociată			
	normal		canceros		normal		canceros		normal		canceros	
	val. absol.	val. relat.	val. absol.	val. relat.	val. absol.	val. relat.	val. absol.	val. relat.	val. absol.	val. relat.	val. absol.	val. relat.
Martor	1 171	100	2 795	100	1 171	100	2 795	100	1 171	100	2 795	100
2 ore	2 370	202	3 245	119	3 638	310,7	2 098	74,3	2 060	175,9	7 713	275
24 ore	3 074	262	3 386	121	5 490	468,8	2 013	72	3 262	278	4 681	167
48 ore	2 283	195	2 327	83,2	2 578	220	1 518	53,9	3 370	202	2 927	104
72 ore	2 902	248	2 701	96,6	4 111	359	1 715	61,3	5 374	458	2 434	83,5
96 ore	2 495	213	2 045	73,1	2 388	202,2	3 305	118,2	2 064	173	1 945	69,5

Lot I — animale injectate cu histamină 1 mg/animal/doză unică i.p.; Lot II — animale injectate cu histamină TPP 2 mg şi piruvat de sodiu 20 mg/animal/doză unică i.p.; Lot III — animale injectate cu histamină 1 mg, TPP 2 mg şi piruvat de sodiu 20 mg/animal/doză unică i.p.

Valorile absolute reprezintă medii ale rezultatelor obţinute pe grupe de cîte 10 şobolani.

Tabela 5

Modificări cantitative ale glucidelor totale în ficatul şobolanilor normali şi purtători de tumoră Jensen, sub influenţa histaminei TPP şi piruvatului de Na

mg/100 g ţesut uscat

Timp	Lot I — histamină				Lot II — TPP + piruvat de Na				Lot III — acţiune asociată			
	normal		canceros		normal		canceros		normal		canceros	
	val. absol.	val. relat.	val. absol.	val. relat.	val. absol.	val. relat.	val. absol.	val. relat.	val. absol.	val. relat.	val. absol.	val. relat.
Martor	3 448	100	10 341	100	3 448	100	10 341	100	3 448	100	10 341	100
2 ore	9 000	261	8 325	80,4	8 794	255	9 562	90,7	7 272	210	7 424	71,8
24 ore	9 027	261	8 229	79,5	7 800	228	6 732	63,9	12 282	356,2	15 208	147
48 ore	6 255	181	7 157	69,1	9 358	271	4 706	45,5	11 917	348	9 604	92,8
72 ore	10 449	303	8 445	81,2	8 558	248,2	6 978	67,3	5 496	159	6 614	63,8
96 ore	9 075	293,1	6 911	66,7	12 082	350	6 133	59,3	13 562	390	6 219	60,1

Lot I — animale injectate cu histamină 1 mg/animal/doză unică i.p.; Lot II — animale injectate cu TPP 2mg şi piruvat de sodiu 20 mg/animal /doză unică i.p.; Lot III — animale injectate cu histamină 1 mg, TPP 2 mg şi piruvat de sodiu 2 mg/animal/ doză unică o.p.

Valorile absolute reprezintă medii ale rezultatelor obţinute pe grupe de cîte 10 şobolani.

Tabela 6

Modificări cantitative ale acizilor hexuronici din ficatul şobolanilor normali şi purtători de tumoră Jensen, sub influenţa histaminei, TPP şi piruvatului sodiu

mg/100 g ţesut uscat

Timp	Lot I — histamină				Lot II — TPP + piruvat de Na				Lot III — acţiune asociată			
	normal		canceros		normal		canceros		normal		canceros	
	val. absol.	val. relat.	val. absol.	val. relat.	val. absol.	val. relat.	val. absol.	val. relat.	val. absol.	val. relat.	val. absol.	val. relat.
Martor	389	100	462	100	389	100	462	100	389	100	462	100
2 ore	403	103,8	226	48,9	106	27,2	424	91,7	121	31,1	129	27,9
24 ore	312	80,2	185	40	151	38,8	325	70,3	148	38,0	310	67
48 ore	134	34,4	141	30,3	168	43,1	365	79	378	97,1	358	77,4
72 ore	254	62,7	190	41,1	151	38,8	338	73,8	202	51,9	310	67
96 ore	254	65,3	289	62,5	136	34,9	391	84,6	538	138,3	458	99,1

Lot I — animale injectate cu histamină 1 mg/animal /doză unică i.p.; Lot II — animale injectate cu TPP 2 mg şi piruvat de sodiu 20 mg/animal/doză unică i.p.; Lot III — animale injectate cu histamină 1 mg, TPP 2 mg şi piruvat de sodiu 20 mg/animal doză comună unică i.p.

Valorle absolute reprezintă valori medii ale rezultatelor obţinute pe grupe de cîte 10 şobolani.

mali s-ar putea interpreta în sensul unei reglări nervoase a biosintezei polimerilor glucidici, ca şi prin stabilitatea de organ caracteristică.

De asemenea, faptul că cele trei tipuri de mediatori determină variaţii cantitative ale monozaharidelor studiate pledează pentru biosinteza de glicoproteine structural diferite, în funcţie de ţesut, de tipul de stimulare şi de starea funcţională a ţesutului.

Într-o lucrare anterioară, în care s-a studiat variaţia cantitativă a proteinelor hepatice şi cerebrale sub influenţa aceloraşi mediatori, administraţi în condiţii similare, s-au observat modificări accentuate şi ale biosintezei proteice [10].

Corespondenţa diferitelor modificări ale biosintezei proteice, în funcţie de mediator, organ şi starea fiziologică, cu cele ale glucidelor cercetate pune în evidenţă raportul dintre biosinteza proteică şi condiţiile energetice diferite.

Corespondenţa directă dintre biosinteza proteică şi cea glucidică a fost studiată de mulţi autori, iar în raport cu cea glicoproteică şi de Winsler [11], care a observat că puromicina inhibă încorporarea glucozaminei $1-{}^{14}C$ în proteinele plasmei simultan cu biosinteza proteică.

Kornfeld şi O' Brein [12] au obţinut, cu ajutorul puromicinei, prin inhibiţie proteică, acumularea de UDP-N-acetilglucozamină.

Din rezultatele noastre reiese acelaşi paralelism între biosinteza proteică şi cea hexozaminică.

Un alt paralelism care reiese din rezultatele noastre este cel dintre acizii hexuronici şi partea proteică a glicoproteinelor. Semnificaţia acestui paralelism rămîne să fie studiată în viitor.

CONCLUZII

Deosebirile de metabolism glucidic dintre ţesutul normal şi cel canceros se pot evidenţia prin administrare de histamină şi mai ales de TPP.

Ţinînd seama de rezultatele lucrării anterioare [10], se observă un paralelism între metabolismul glucidic şi cel proteic.

Paralelismul observat între modificările proteice şi cele hexozaminice indică hexozamina ca monozaharid de legătură (cu prioritate) între partea glucidică şi cea proteică în polimerii glicoproteici.

Din faptul că modificările acizilor hexuronici nu au fost echimolare cu cele ale hexozaminelor şi că, dimpotrivă, biosinteza lor a fost inhibată, în timp ce aceea a hexozaminelor a fost stimulată, reiese că are loc o biosinteză de glicoproteine, şi nu una de mucopolizaharide.

Răspunsul diferit faţă de aceiaşi mediatori chimici scoate în evidenţă deosebirile de biosinteză glicoproteică dintre ţesutul normal şi cel canceros.

Prezentată la redacţie la 10 februarie 1968

Institutul oncologic, Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. Z. Stary, A. Wardi, D. Turner, Biochim. biophys. Acta, **83**, 242 (1964).
2. R. Macbeth, G. Bekesi, Cancer Res., **24**, 614 (1964).
3. M. Dubois, W. H. Hamilton, F. Smith, Anal. Chem., **28**, 350 (1956).

4. R. F. WINZLER, *Methods of Biochemical Analysis* sub red. DAVID GLICK, vol. 2, Ed. Intersci, New York, 1955, p. 290.
5. Z. DISCHE, *Methods of Enzymology*, vol. 3, Academic Press, New York, 1957, p. 93.
6. Z. DISCHE, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem., **IV**, 711 (1960).
7. R. F. WINZLER, *Method of Biochem. Analysis*, vol. 2, sub red. DAVID GLICK, Ed. Intersci. New York, 1955, p. 279.
8. M. NEUTRA, P. C. LEBLOND, J. Cell Biol., **30**, 1321 (1966).
9. L. F. LELOIR, Biochem. J., **91**, 1 (1964).
10. I. KIŢULESCU., T. RUSĂNESCU, V. BĂLUŢĂ, A. CURIGUŢ, Radiologia şi oncologia, **5**, 403 (1967).
11. J. MOLNAR, R. LUTES, Cancer Res., **25**, 1438 (1965).
12. S. KORNFELD, R. KORNFELD, E. NEUFELD, P. O'BRIEN, Proc. nat. Acad. Sci., Wash., **52**, 371 (1964).
13. E. F. SARCIONE, J. biol. Chem., **239**, 1686 (1964).
14. SU CHAN LI, YU TEH LI, M. N. SHETLAR, Congres International de Biochimie, Tokyo, 1967.
15. I. KIŢULESCU, D. PASCU, T. RUSĂNESCU, Oncologia şi radiologia, **5**, 25 (1966).

QUANTITATIVE MODIFICATIONS OF SOME TISSULAR MONOSACCHARIDES UNDER THE ACTION OF HISTAMINE, TPP AND SODIUM PYRUVATE

SUMMARY

The quantitative modifications of the following monosaccharides: hexosamine, methylpentose, hexuronic acids, neutral hexoses, and total carbohydrates, were studied in normal and cancerous, rat under the action of histamine, thiamine pyrophosphate and sodium pyruvate.

Results indicated that these substances can influence carbohydrate metabolism while normal and cancerous rats differently respond, under the same experimental conditions.

ST. CERC. BIOCHIM., 12, 1, 91 – 94 (1969)

UNELE ASPECTE ALE EXOSMOZEI FOSFORULUI ANORGANIC DIN MUȘCHIUL GASTROCNEMIAN DE BROASCĂ ÎN NARCOZĂ

L. SCOLNIC

Rezumat. În cazul narcozei cu sacrificare la 15 și 60 min, exosmoza fosforului anorganic din mușchiul gastrocnemian de broască este semnificativ scăzută. În procedeul de legare cu nod dublu a unuia din picioarele posterioare, deasupra mușchiului gastrocnemian, în scopul de a urmări pe același animal influența unui tratament, este necesar să se imobilizeze perfect piciorul nelegat. Efectul narcozei poate fi mascat în cazul cînd mușchiul aflat sub acțiunea novocainei efectuează una sau mai multe concentrații.

Este știut că prin fenomenul exosmozei se pot urmări diferite aspecte ale metabolismului organelor și țesuturilor [1], [2], [3] și se poate caracteriza starea funcțională a acestora [4], [5].

Într-o lucrare anterioară [6] în care am cercetat influența exercitată de novocainǎ asupra exosmozei substanțelor reducătoare din mușchiul gastrocnemian de broască, am recurs la un procedeu folosit și cu altă ocazie [7], și anume legarea cu nod dublu a unuia din picioarele posterioare, deasupra mușchiului gastrocnemian, în scopul de a împiedica pătrunderea novocainei în piciorul legat. Urmărind dacă legarea însăși nu modifică cantitatea substanțelor reducătoare exosmozate, am stabilit că, dacă piciorul liber, nu se imobilizează perfect nu se obțin valori concordante la cei doi mușchi simetrici [6].

Același procedeu de urmărire a influenței tratamentului aplicat pe același animal a mai fost folosit și într-o lucrare în care s-a cercetat exosmoza fosforului anorganic în narcoză și mișcarea pasivă [8], unde nu s-au luat măsuri de imobilizare totală a mușchiului aflat sub acțiunea narcoticului.

Deoarece contracția mușchiului intensifică exosmoza substanțelor reducătoare [9], precum și a fosforului [5], ne-am pus problema dacă nu cumva și în cazul exosmozei fosforului anorganic în narcoză [8] modificările de permeabilitate puse pe seama influenței novocainei asupra animalului sacrificat după 15 min de la injectare s-ar datora tot contracțiilor efectuate în decursul experienței de mușchiul piciorului liber.

Pentru verificarea acestei supoziții am efectuat o serie de determinări în care am urmărit exosmoza fosfatului anorganic din mușchii simetrici ai aceleiași broaște avînd unul dintre picioare legat.

Din tabela 1 se observă, așa cum era de așteptat, că din mușchiul provenit de la piciorul legat și împiedicat astfel să se contracte difuzează în

soluția salină înconjurătoare cantități mai mici de fosfat anorganic în comparație cu mușchiul provenit de la piciorul liber și care a efectuat una sau mai multe contracții.

Se impunea deci, înainte de a trece la determinările propriu-zise, să se imobilizeze perfect piciorul nelegat. După cum rezultă din tabela 2,

Tabela 1

Fosfatul anorganic difuzat într-o soluție salină 0,7% din mușchii gastrocnemieni simetrici de broască. Un picior este legat, celălalt liber

A = perioada scursă de la legare pînă la sacrificarea broaștei, 15 min; *B* = perioada scursă de la legare pînă la sacrificarea broaștei, 60 min.

Mușchi stîng = *S* (picior legat) Mușchi drept = *D* (martor)

	A			*B*		
	μg *P*			μg *P*		
	S	*D*	Dif.	*S*	*D*	Dif.
	36	54	−18	10	14	− 4
	36	56	−20	22	27	− 5
	10	14	− 4	15	23	− 8
	15	21	− 6	63	79	−16
	24	42	−18	13	17	− 6
	77	95	−18	18	24	− 6
Media :	33	47	−14	23	30	− 7

Tabela 2

Fosfatul anorganic difuzat într-o soluție salină 0,7% din mușchii gastrocnemieni de broască. Un picior este legat celălalt imobilizat

A = perioada scursă de la legare pînă la sacrificarea broaștei, 15 min; *B* = perioada scursă de la legare pînă la sacrificarea broaștei, 60 min.

Mușchi stîng = *S* (picior legat) Mușchi drept = *D* (martor, picior imobilizat)

	A			*B*		
	μg *P*			μg *P*		
	S	*D*	Dif.	*S*	*D*	Dif.
	20	22	−2	33	35	−2
	18	17	1	24	27	−3
	31	29	2	13	12	1
	53	57	−4	26	30	−4
	10	12	−2	20	18	2
	37	39	−2	15	13	2
Media :	28	29	−1	22	23	−1

cantitățile de fosfor anorganic exosmozat din cei doi mușchi simetrici proveniți de la broaște cu un picior legat și celălalt imobilizat sînt practic concordante.

Odată aceste condiții stabilite, se putea trece la urmărirea influenței novocainei asupra exosmozei fosforului anorganic. Din tabela 3 se constată că, atît la 15, cît și la 60 min, novocaina reduce cantitatea fosforului anorganic exosmozat.

Tabela 3

Fosfatul anorganic difuzat într-o soluție salină 0,7% din mușchiul gastrocnemian de broască. Un mușchi este sub influența novocainei, mușchiul simetric legat normal

A = durata narcozei, 15 min; *B* = durata narcozei, 60 min

Mușchi normal = *N* (picior legat)				Mușchi sub acțiunea novocainei = *n* (picior imobilizat)		
A				*B*		
μg *P*				μg *P*		
	n	*N*	Dif.	*n*	*N*	Dif.
	15	37	−22	4	9	− 5
	45	52	− 7	29	39	−10
	44	95	−51	4	7	− 3
	53	104	−51	14	29	−15
	84	110	−26	30	44	−14
	53	84	−31	18	27	− 9
Media :	49	80	−31	16	26	−10

Comparînd rezultatele obținute de noi cu cele publicate [8], rezultă că și în cazul narcotizării, cu sacrificarea după 15 min, exosmoza fosforului anorganic este semnificativ scăzută. Modificarea de permeabilitate pusă pe seama influenței novocainei timp de 15 min [8] se datorește contracțiilor efectuate de mușchi în decursul experienței. În cazul cînd mușchiul nu este împiedicat să se contracte, efectul novocainei asupra exosmozei fosforului este mascat de contracția lui.

Prezentată la redacție la 11 martie 1968

Institutul de biochimie al Academiei Republicii Socialiste România

BIBLIOGRAFIE

1. E. Macovschi, Com. Acad. R.P.R., **V**, 1171 (1955).
2. E. Macovschi, O. Zaharia, N. Moldoveanu, Bul. șt. Acad. R.P.R., **VII**, 199 (1955).
3. E. Macovschi, S. Comoroșan, St. cerc. chim., **4**, 271 (1956).
4. E. Macovschi, V. Panaitide, Com. Acad. R.P.R., **V**, 811 (1955).
5. E. Macovschi, Tr. Rădulescu, L. Scolnic, St. cerc. biochim., **5**, 485 (1962).
6. L. Scolnic, St. cerc. biochim., **11**, 305 (1968).
7. Tr. Rădulescu, D. Cotariu, L. Scolnic, St. cerc. biochim., **7**, 97 (1964).
8. Tr. Rădulescu, D. Cotariu, St. cerc. biochim., **7**, 243 (1964).
9. L. Scolnic, St. cerc. biochim., **9**, 299 (1966).

SOME ASPECTS OF INORGANIC PHOSPHATE EXOSMOSIS OF FROGS GASTROCNEMIUS MUSCLES UNDER ANAESTHESIA

SUMMARY

Frogs under anaesthesia killed 15 and 60 minutes, respectively, after the beginning of the treatment, show a significantly low exosmosis of inorganic phosphorus from frog gastrocnemius muscles.

When the procedure of fastening one of the hind limbs with double knot above the gastrocnemius muscle is applied in order to follow the treat ment influence on the same animal the total immobilization of the other-hind limb is necessary.

The effect of anaesthesia can be masked if muscles under the action of novocaine perform one or several contractions.

S. A. NEIFACH, *Mehanizmî integrații kletocinogo obmena* (*Mecanismele de integrare ale metabolismului celular*), Edit. Nauka, Leningrad, 1967.

Nu de mult a apărut, sub redacția profesorului S.A. Neifach, membru corespondent al Academiei de științe din U.R.S.S., o monografie dedicată problemei mecanismelor de integrare ale metabolismului celular. După cum subliniază autorul în prefața volumului său, monografia se referă mai ales la mecanismele de integrare ale metabolismului energetic, adică ale procesului fundamental care leagă toate aspectele metabolismului celular într-un singur sistem.

Lucrarea se axează pe ideea că procesul integrării, caracteristic viului, constă în interdependența dintre componentele sistemului și sistemul întreg, în sensul că funcțiile componentelor depind de sistem, iar acesta nu poate funcționa decît cu participarea tuturor componentelor din care este alcătuit.

Cartea cuprinde șase capitole, scrise de diferiți specialiști. Astfel: capitolul I se referă la factorii dinamici-structurali și genetici — ai integrării metabolismului (S.A. Neifach); capitolul II: Organizarea structurală și moleculară a fotosintezei (O.P. Osipova); capitolul III: Organizarea structurală a oxidării biologice și a proceselor cuplate cu aceasta (V.S. Gaitskhoki); capitolul IV: Controlul genetic al sintezei elementelor structurale ale lanțului respirator (T.B. Razekova); capitolul V: Coordonarea respirației și glicolizei (V.S. Repin); capitolul VI: Cuplarea energetică între oxidare și transportul activ (N.K. Monakhov).

Volumul cuprinde 315 pagini text, 21 de tabele și 68 de figuri, iar lista bibliografică citează 983 de lucrări.

Socotim că această carte prezintă interes deosebit pentru toți cei care lucrează în domeniul biochimiei și fiziologiei.

E. Macovschi

Institutul de biochimie al Academiei
Republicii Socialiste România

Handbuch der experimentellen Pharmakologie, vol. XXII: *Die Gestagene* (*Tratat de farmacologie experimentală*, vol. XXII: *Substanțele gestagene*), Springer Verlag, Berlin — Heidelberg — New York, 1968, 1178 p., 115 fig.

Volumul XXII din *Handbuch der experimentellen Pharmakologie* cuprinde prima parte a unei monografii, realizată sub conducerea lui Karl Junkman, despre substanțele gestagen.

Scopul autorilor a fost de a reuni într-o singură lucrare de sinteză toate datele teoretice și experimentale cunoscute pînă la ora actuală în acest domeniu.

Dezvoltarea sintezei organice, precum şi volumul mare de date obţinute în ultimii ani în ceea ce priveşte stereochimia, proprietăţile chimice şi biologice ale hormonilor steroizi au făcut necesară alcătuirea acestei monografii. Partea I a acestei lucrări cuprinde 8 capitole :

Capitolul I (autor K. Junkman) tratează despre constituţia chimică şi configuraţia, nomenclatura, proprietăţile fizice şi chimice ale hormonilor gestageni. Probleme de chimie a unor reprezentanţi mai importanţi ai acestei clase de compuşi sînt prezentate separat. Sînt descrise metode microchimice, histochimice şi cu izotopi marcaţi de identificare a substanţelor gestagene naturale şi sintetice, a precursorilor şi metaboliţilor lor în ţesuturi, organe şi lichide biologice.

Prezentînd o importanţă deosebită, progesterona, hormon gestagen natural, este tratată în amănunţime într-un subcapitol aparte ; sînt urmăriţi precursorii şi metaboliţii acestui hormon în diferite materiale biologice.

În capitolul II se analizează principalele faze pe care le suferă metabolismul progesteronei : biogeneza în diferite organe, viteza de producere a progesteronei şi hormonilor înrudiţi, degradarea metabolică şi eliminarea atît la om, cît la diferiţi reprezentanţi ai regnului animal, insistîndu-se mai mult asupra mamiferelor.

Resorbţia, metabolizarea şi eliminarea celorlalte substanţe gestagene naturale şi sintetice sînt prezentate în capitolul III (autor Hedwig Langecker). Aceste procese sînt urmărite în diferite organe şi ţesuturi, atît pentru organismul uman, cît şi pentru cel animal.

Capitolul IV (autori H. Gibian şi Renate Unger) urmăreşte acţiunea substanţelor gestagene asupra variatelor aspecte metabolice ale întregului organism şi asupra diverselor organe, *in vivo* şi *in vitro*.

Acţiunea specială a acestor substanţe asupra microorganismelor, plantelor, animalelor şi omului este prezentată în capitolul V (autori M. Kramer, Leonore Damrosch şi G. Klink). O atenţie deosebită este acordată influenţei acestor substanţe asupra organelor interne ale organismului uman. În încheierea acestui capitol sînt analizate unele date cu privire la acţiunea substanţelor gestagene asupra tumorilor de toate tipurile.

În capitolul VI (autor F. Neumann) se expun metodele generale folosite pentru stabilirea legăturii dintre constituţia chimică şi activitatea farmacodinamică, precum şi rezultatele experimentale obţinute în acest domeniu. Tot în acest capitol sînt prezentate tabele de activitate care reunesc, în rezumat, cîteva proprietăţi fizico-chimice, teste de activitate pe animal şi om şi dozele corespunzătoare ale substanţelor gestagene naturale şi sintetice cunoscute pînă în prezent, dîndu-se totodată şi referinţele bibliografice corespunzătoare.

În capitolele VII şi VIII (autori J. Ufer şi J. Haller) sînt descrise utilizările terapeutice ale substanţelor gestagene atît în ceea ce priveşte unele tulburări ale activităţii organelor genitale sau unele tumori, cît şi în ceea ce priveşte terapia anticoncepţională.

Bibliografia deosebit de vastă care stă la baza acestei monografii este indicată la sfîrşitul fiecărui capitol. Materialul expus este întregit prin tabele de valori experimentale, grafice, spectre de IR, diagrame şi figuri.

Lucrarea pune la dispoziţia cercetătorului un mare volum de date, prezentate cu claritate şi precizie, fiind astfel de un real folos.

O. Macovschi

Institutul de biochimie al Academiei
Republicii Socialiste România

SIDNEY A. BERNHARD, *The structure and function of enzymes* (*Structura și funcția enzimelor*), W. A. Benjamin, Inc., New York — Amsterdam, 1968, 324 p.

Această carte face parte din seria de monografii menite să întregească cursurile de biologie pentru studenți, editată de cunoscutul editor și om de știință Cyrus Levinthal.

Un prim capitol, în care se face un istoric al enzimologiei și se expun axiomele pe care aceasta se bazează, este urmat de un al doilea, în care se trec în revistă forțele de natură fizică, existente la baza interacțiunii dintre atomi și molecule. Subiectul este tratat în limitele necesare înțelegerii interacțiunii specifice enzimă-substrat, cu toate implicațiile corespunzătoare.

O dată cu capitolul al treilea se intră în subiectul propriu-zis, legătura chimică și structura proteinelor. Începînd cu discutarea configurației sterice a moleculelor simple (ex. l-treonina), autorul continuă cu discutarea unor structuri mai complexe (α-helixul) și a metodelor respective de studiu. În restul capitolului se expune apoi problema regularităților de structură a catenei și a structurii proteinelor în soluții. Capitolul se încheie cu problema dependenței structurii și funcției proteinelor de secvența aminoacizilor.

În capitolul următor se trec în revistă modelele cele mai răspîndite ale catalizei și inhibiției enzimatice și se discută bazele aplicabilității lor. Se începe cu echilibrul chimic, reacțiile reversibile și ireversibile, cărora le urmează modelele de inhibiție a catalizei reacțiilor ireversibile. Chestiunea reacțiilor metastabile intermediare și a celor în care sînt implicate mai multe substraturi încheie abordarea problemei reglării activității enzimatice în legătură cu interacțiunile dintre locurile active, acolo unde este cazul. Capitolul se termină cu discutarea sistemelor reversibile caracterizate prin una sau mai multe trepte.

În continuare, se expun problema sistemelor specifice enzimă-substrat, cinetica acestora și mecanismele respective. Întrucît conformația spațială a proteinelor enzimatice este determinantă, capitolul următor este dedicat problemei secvenței aminoacizilor, agregării polipeptidelor în sisteme oligomere, configurațiilor active și inactive, denaturării și efectului exercitat asupra activității de modificările introduse la nivelul aminoacizilor.

În capitolul următor se abordează discutarea unor mecanisme și modele ale catalizei enzimatice, definindu-se cîteva tipuri de procese catalitice : cataliza nucleofilă și electrofilă, generală acido-bazică și dependența de pH. În acest cadru se acordă un loc special coenzimelor și cofactorilor, precum și modelării acțiunii lor.

Legătura dintre principiile și metodele discutate și mecanismele specifice catalizei enzimatice se face în ultimul capitol. Se discută sistemele : α-chimotripsina, enzimele piridoxalfosfatice, dehidrogenazele cu nucleotide piridinice și enzimele alosterice : izocitrat-dehidrogenază și aspartat-transcarbamilază. Dintre enzimele a căror structură tridimensională a fost descifrată în întregime, se discută numai carbonic-anhidrază și lizozimul.

Volumul mai cuprinde un apendix cu modelele spațiale ale α-chimotripsinei și ribonucleazei-s și un index de materii. Fiecare capitol este prevăzut cu o bibliografie esențială, recentă.

Calitățile deosebite de fond și formă fac ca acest volum să fie de un real interes nu numai pentru chimiști și biologi. Se completează în mod substanțial literatura științifică într-un domeniu aflat în continuă și rapidă evoluție.

V. Eșanu

Institutul de biologie „Tr. Săvulescu"

CHEMICAL BIOLOGY OF INFLAMMATION (*Chimia biologică a inflamației*), Lucrările conferinței ținute la 31 mai — 2 iunie 1967 la Brook Lodge, Augusta, Michigan, S.U.A., sub patronajul Upjohn Company, sub red. JOHN C. HOUCK și BERNARD K. FORSCHER, Pergamon Press, Oxford—Londra—Edinburgh—New York—Toronto—Sidney—Paris—Braunschweig, ediția I, 1968, supliment la „Biochemical Pharmacology", Pergamon Press, 1968.

Scopul principal al acestei conferințe, care a reunit un număr relativ restrîns de participanți (48), cuprinzînd pe cei mai prestigioși cercetători ai acestui domeniu de mare interes teoretic și practic, a fost găsirea unui limbaj comun între cercetătorii ce studiază aspectele chimice ale inflamării și cei care îi studiază aspectele biologice.

Prezentarea lucrărilor începe cu un scurt referat, în care J. C. Houck, președintele conferinței, enumeră principalele procese implicate în răspunsul țesutului la agresiuni.

Lucrările prezentate sînt grupate în 7 secțiuni: modele și metode utilizate în studiul inflamării; imunologie; un referat de mari proporții intitulat „Inflamarea, lezarea locală și conceptul de boli pluricauzale"; două secțiuni consacrate inflamării la nivel celular și două secțiuni despre chimia și biologia inflamării.

Deosebit de interesante și utile pentru biochimiști sînt lucrările din secțiunile de chimia și biologia procesului inflamator, care se ocupă cu studii enzimatice (D. Lagunoff, A. Bertelli, S. Rothberg și G.D. Axilrod), studii de proteine (J.A. Gladner, P.A. Murtaugh și J.C.Houck), farmacologie moleculară (M.W. Whitehouse, A. Gouth), sinteză de proteine (B.Rokosová-Čmuchalová și J.P. Bentley), studiul kininelor și al enzimelor pe care le implică ele în inflamare (K. L. Melmon și M. J. Cline), studiul proceselor biochimice ce au loc în cursul coagulării (J.A. Gladner, P.A. Murtaugh și J.C. Houck, T. Astrup) etc.

Lucrările se disting prin concizie, coeziune și claritate, reușind să îmbine în chip fericit considerațiile teoretice cu argumentele de ordin experimental. Materialul ilustrativ folosit este bogat; se prezintă numeroase date prelucrate statistic, iar acolo unde este nevoie sînt reproduse și formule chimice. Volumul conține 71 de scheme și grafice, 86 de tabele, 112 fotografii alb-negru și 9 fotografii color.

În încheierea fiecărei lucrări sînt relatate discuțiile pe care ea le-a suscitat.

Întreaga lucrare (337 de pagini) se remarcă printr-o ținută grafică excepțională. Pentru a se facilita folosirea ei, i-au fost atașate indexuri de subiecte și de autori.

Florin Mihăilescu
Institutul de biochimie
al Academiei Republicii Socialiste România

PETER BERNFELD, *Biogenesis of natural compounds (Biogeneza compușilor naturali)*, ed. a 2-a, Pergamon Press, Londra, 1967, 1209 p.

Prima ediție a acestei lucrări (1963) intenționa să ofere o vedere generală asupra cunoștințelor curente despre biogeneza compușilor care apar în natură. Apariția după numai 4 ani a unei noi ediții a fost determinată de extrem de rapida dezvoltare a cunoștințelor biochimice în multe din subiectele tratate. Lucrarea a fost deci considerabil îmbogățită, cele mai multe capitole au fost aduse la zi.

Operă colectivă a 24 de autori, fiecare cu incontestabilă autoritate în sfera sa particulară de preocupări, cartea cuprinde 19 capitole, care tratează cîte un grup distinct de substanţe înrudite între ele prin analogie chimică, prin origine sau activităţi funcţionale asemănătoare.

Compuşii naturali care apar atît în regnul animal, cît şi în cel vegetal sînt trataţi în prima parte a acestei cărţi, partea a doua cuprinzînd capitole ce se ocupă de substanţe biosintetizate doar de plante sau microorganisme. Astfel, primele 11 capitole cuprind o tratare sistematică şi amănunţită a biosintezei unor compuşi de largă răspîndire şi de interes major, ca aminoacizii, nucleotidele purinice şi pirimidinice, lipidele, steroizii, porfirinele şi pigmenţii biliari, glucidele, proteinele, acizii nucleici, produşii de conjugare şi detoxifiere. În următoarele 7 capitole se tratează biosinteza unor substanţe ce apar în lumea vegetală sau microbiană, ca produşii fenolici vegetali, terpenele, ligninele, cauciucul, alcaloizii, taninurile, iar capitolul final, nou adăugat faţă de prima ediţie, se ocupă de formarea hidrocarburilor polinucleare carcinogenice.

Cu toate că o acoperire completă a aspectelor biosintetice ale tuturor compuşilor naturali nu este posibilă în limitele unui volum de această natură, cele mai multe din substanţele organice mai importante de origine animală, vegetală sau microbiană ce apar în mod natural sînt bine reprezentate.

Fiecare capitol se încheie cu o bogată bibliografie, numărul total de indicaţii bibliografice din carte ridicîndu-se la 5891 de referinţe, iar la sfîrşitul volumului se dă cîte un index de autori şi subiecte.

Volumul este în acelaşi timp un manual, un tratat general şi o lucrare de referinţă şi se adresează atît studenţilor, cît şi cercetătorilor.

Ileana Mihăilescu

Laboratorul de biochimie,
Facultatea de medicină, Bucureşti

Monografia *Les interrelations vitaminiques* (*Interrelaţiile vitaminice*), din seria analelor de nutriţie şi de alimentaţie, de *Thérèse Terroine*, Centre national de la recherche scientifique, 1966, 270 p.

Trei din marii vitaminologi, Funk, Hopkins şi Mouriquand, au definit noţiunea de „interrelaţii vitaminice". Începînd din 1943 şi pînă în 1962 au apărut o serie de referate asupra acestor interrelaţii. Deoarece între timp s-au semnalat o mulţime de noi tipuri de interrelaţii şi s-au aprofundat mecanismele raporturilor dintre vitamine, s-a impus o nouă punere la punct, mai ales din necesitatea fixării cantităţii optime de vitamine în raţie, ca şi pentru o terapeutică cît mai raţională cu aceste substanţe.

Volumul, foarte bine sistematizat, este împărţit în trei capitole mari. Primul capitol, „Diversele modalităţi de interrelaţii", este centrat pe prezentarea a trei feluri de acţiuni: vicariante, secundare, simultane. Cel de-al doilea capitol „Mecanisme", prezintă interdependenţa dintre diferite vitamine, reglarea conţinutului vitaminic al ţesuturilor, a aportului şi pierderilor, precum şi contribuţia acestor reglări asupra integrităţii structurale a ţesuturilor şi celulelor, asupra proceselor metabolice. Capitolul al treilea, „Consideraţii generale", pune în discuţie atît limitele interrelaţiilor, cît şi variaţiile în funcţie de doză. În continuare se arată că trebuie să se ţină seama de aceşti factori la întrebuinţarea terapeutică a vitaminelor, la întrebuin-

ţarea metodelor biologice de dozaj, la fixarea normelor necesarului de vitamine şi la posibilitatea înlocuirii unei vitamine printr-un factor nevitaminic etc.

Cartea este scrisă într-un stil curgător şi de aceea uşor de citit. Poate excesiva subîmpărţire a capitolelor să aducă un prejudiciu cursivităţii cărţii.

Numele autoarei, specialist cunoscut în acest domeniu, precum şi bibliografia foarte bogată (800 de trimiteri) atestă seriozitatea şi valoarea volumului.

Cecilia Motaş

Institutul de biochimie al Academiei
Republicii Socialiste România

Handbuch der allgemeinen Pathologie, II/5, Stoffwechsel und Feinstruktur der Zelle, I (*Manual de patologie generală*, vol. II, partea a 5-a, *Metabolism şi infrastructură celulară*, I), sub red. F. BÜCHNER, Springer, Berlin—Heidelberg—New York, 1968, 799 p.

Acest volum cuprinde patru mari capitole în care sînt expuse şi discutate pe larg probleme de morfologie şi de biochimie celulară.

Primul capitol, intitulat „Biochimia structurii celulare", este scris de prof. G. Siebert, specialist în acest domeniu. După o scurtă introducere privind metodele de izolare a structurilor subcelulare, acestea sînt cercetate, pe rînd, în ordinea : nucleu, mitocondrii, lizozomi, fracţiuni microzomiale, componenţi solubili din citoplasmă. Pentru fiecare din ele se arată compoziţia chimică, se prezintă procesele metabolice specifice şi se subliniază modificările patologice întîlnite.

În al doilea capitol, intitulat „Ortologia şi patologia celulară în imaginea microscopiei electronice" şi scris de prof. Elisabeth Mölbert, sînt studiate în amănunt structurile mitocondriilor, reticulului endoplasmatic şi aparatului Golgi, relevate de cîmpul microscopului electronic. Pe lîngă date preţioase din punct de vedere morfologic, sînt prezentate şi procese din domeniul biochimiei dinamice (sinteze de substanţe, reînnoiri, degenerescenţe), surprinse în imaginea microscopului electronic.

Al treilea şi al patrulea capitol, scrise — respectiv — de B. Schultze şi prof. W. Oehlert, sînt consacrate studiului autoradiografic al metabolismului normal şi patologic al acizilor nucleici, proteinelor şi sulfului. După descrierea amănunţită a diverselor tehnici autoradiografice, se prezintă sistematic toate procesele desfăşurate în organitele celulare şi care au putut fi prinse în autoradiograme.

Fiecare din cele patru capitole ale volumului are o individualitate proprie, bine conturată ; totuşi, datorită faptului că toate au acelaşi obiect de studiu, infrastructura celulară, datele unui capitol se întrepătrund şi se completează cu datele celorlalte. În felul acesta, volumul oferă, în ansamblu, un studiu complet al infrastructurilor celulare. Totodată, el reliefează avantajele metodelor moderne de microscopie electronică şi autoradiografie, folosite cu mult succes în acest domeniu.

Întreg materialul tratat se bazează pe o bibliografie amplă, adusă la zi, şi este bogat ilustrat cu 191 de figuri.

Prezentată într-o formă sistematizată şi logică, la înalt nivel ştiinţific, lucrarea se adresează biologilor, patologilor, morfologilor şi biochimiştilor.

Aurora Popescu

Catedra de chimie biologică I,
I.M.F., Bucureşti

„Studii şi cercetări de biochimie" publică articole originale, de nivel ştiinţific superior, din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici, ca : Viaţa ştiinţifică, în care prin scurte note, sînt aduse la cunoştinţa cititorilor unele manifestări din domeniul biochimiei : congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experienţă între cercetătorii români şi cei străini etc. Recenzii — în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în ţară şi peste hotare.

NOTA CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugaţi să înainteze articolele, notele şi recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuş, pe hîrtie de calc. Tabelele şi ilustraţiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planşe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea acelorași date în text, tabele şi grafice. Explicaţia figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de iniţiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanţelor internaţionale.

Autorii au dreptul la un număr de 50 de extrase, gratuit.

Responsabilitatea asupra conţinutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondenţa privind manuscrisele, schimbul de publicaţii etc, se va trimite pe adresa Comitetului de redacţie : str. Docenţilor nr. 20, Bucureşti 63, Sectorul I.

1969 MAR 2

LUCRĂRI APĂRUTE ÎN EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

R. PORTOCALĂ şi L. POPA, **Acizii ribonucleici celulari şi virali,** 1966, 25 × 17,50, 375 p., 8 pl., legat, anvelopă, 26 lei.

M. G. BALS, **Imunofluorescenţa şi aplicaţiile ei în inframicrobiologie,** 1966, 25 × 17,50, 285 p., 18 pl., legat, anvelopă, 27 lei.

ION CANTACUZINO, **Opere alese, Œuvres choisies,** 1965, 25 × 17,50, 687 p., legat, anvelopă, 44 lei.

* * * **Omagiu acad. prof. RALUCA RIPAN,** 1966, 30,50 × 21,50, 628 p. + 2 pl., legat, anvelopă, 50 lei.

La revue „Studii şi cercetări de biochimie" paraît 4 fois par an. Le prix d'un abonnement annuel est de $ 5 — FF. 25 — DM. 20 — Toute commande à l'étranger sera adressée à CARTIMEX, Boîte postale 134—135 Bucarest, Roumanie ou à ses reprèsentants à l'étranger". En Roumainie, vous pourrez vous abonner par les bureaux de poste ou chez votre facteur.

ST. CERC. BIOCHIM. TOMUL 12, NR.1, P. 1 — 100 BUCUREŞTI, MARTIE 1969

I. P. Informaţia — c. 6159

43816

Lei 20.

F. 1330

studii şi cercetări de biochimie

2

TOMUL 12

1969

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

St. cerc. biochim., tomul 12, nr. 2, p. 101—204, Bucureşti, mai, 1969

COMITETUL DE REDACȚIE

Redactor responsabil:

ACADEMICIAN E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUȘANSCHI

Membri:

S. OERIU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; M. MEZINCESCU; I. VASILESCU; TR. RĂDULESCU; VICTORIA ALEXANDRESCU.

Secretar de redacție:

VICTOR GHEȚIE

Revista apare de 4 ori pe an.

Prețul unui abonament anual este de 80 lei.

În țară abonamentele se fac la oficiile poștale, agențiile poștale, factorii poștali și difuzorii voluntari din întreprinderi și instituții.

Orice comandă din străinătate (numere izolate sau abonamente) se fac prin CARTIMEX, Căsuța poștală 134—135, București, Republica Socialistă România, sau prin reprezentanții săi din străinătate.

Manuscrisele, cărțile și revistele pentru schimb, precum și orice corespondență se vor trimite pe adresa comitetului de redacție al revistei „Studii și cercetări de biochimie".

ADRESA REDACȚIEI

București, str. Docenților nr. 20

Sectorul 1

E 1330

ACADEMIA REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

BIOCHIMIE

Tom. 12, nr. 2 1969

SUMAR

Pag.

E. MACOVSCHI, Eliberarea parţială a apei biostructurale în prezenţa inhibitorilor metabolici 105

E. MACOVSCHI, V. FRUNZETI-ELEFTERESCU, Ribonucleazele în sucurile frunzelor de porumb (Consideraţii în lumina teoriei biostructurii) 115

V. ALEXANDRESCU, D. POPOV, Acţiunea diverşilor ioni asupra activităţii fosfatazei acide din porumb 121

I. BRAD, Z . MARCU, E. MOLDOVEANU, ŞT. NICULESCU, Se diferenţiază izoenzimele şi prin coeficientul van't Hoff? 129

S. COMOROŞAN, Fenomene cuantice în biologie. Un nou punct de vedere teoretic şi experimental 135

Ş. CSÖGÖR, M. KEREKES, Capacitatea de a fixa roşul de Congo a proteinelor serice denaturate în prezenţa zaharozei 153

P. FURDA, A. KOVACS, M. KEREKES, Comportarea grupărilor fenolice mascate ale tripsinei sub acţiunea denaturanţilor 157

D. MOŢOC, C. BANU, Modificări în activitatea enzimatică a muşchiului psoas de vită păstrat la +4°C 163

M. ŞERBAN, D. COTARIU, Biochimia comparată a izoenzimelor. IV. Izoenzimele lacticodehidrogenazei din muşchii scheletici în seria vertebratelor . . . 173

REFERAT GENERAL

G. NEAMŢU, Aspecte privind biosinteza pigmenţilor carotinoidici 181

RECENZII 199

St. cerc. biochim., tomul 12, nr. 2, p. 101—204, Bucureşti, mai 1969

ACADEMIA REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

BIOCHIMIE

Tomul 12, nr. 2 1969

CONTENTS

Page.

E. MACOVSCHI, The partial release of biostructure water in the presence of metabolic inhibitors 105

E. MACOVSCHI, V. FRUNZETI-ELEFTERESCU, Ribonucleases in maize leaf saps. (Considerations in the light of the biostructural theory) 115

V. ALEXANDRESCU, D. POPOV, The influence of some ions on the activity of maize acid phosphatase 121

I. BRAD, Z. MARCU, E. MOLDOVEANU, ŞT. NICULESCU, Can the van't Hoff's coefficient be a criterion for differenciating isoenzymes? . . . 129

S. COMOROŞAN, Quantum phenomena in biology. A new theoretical and experimental approach 135

S. CSÖGÖR, M. KEREKES, The Congo-red binding capacity of serum proteins denatured in the presence of sucrose 153

P. FURDA, A. KOVACS, M. KEREKES, Behaviour of masked phenol groups of trypsin under the action of denaturing agents 157

D. MOŢOC, C. BANU, Changes in enzyme activity of beef Psoas muscle stored at +4°C 163

M. ŞERBAN, D. COTARIU, Comparative biochemistry of isoenzymes. IV. Lactate dehidrogenase isoenzymes in skeletal muscles, in the phylogeny of vertebrates 173

REVIEW

G. NEAMŢU, Some aspects of carotenoid biosynthesis 181

BOOK REVIEW 199

St. cerc. biochim., tomul 12, nr. 2, p. 101—204, Bucureşti, mai 1969

ST. CERC. BIOCHIM., 12, 2, 105–114 (1969)

ELIBERAREA PARȚIALĂ A APEI BIOSTRUCTURALE ÎN PREZENȚA INHIBITORILOR METABOLICI

EUGEN MACOVSCHI

Rezumat. Conform teoriei noastre, o parte din materia din protoplasma vie este integrată într-o structură cu totul specială, numită biostructură, care există datorită aportului de energie metabolică și se destramă o dată cu moartea protoplasmei. Rezultă că inhibitorii metabolici (dinitrofenolul, azida de sodiu etc.), introduși în orice material biologic viu, ar trebui să aibă ca efect destrămarea parțială a biostructurii și punerea în libertate a apei integrate în ea și a altor componente biostructurale. Această prevedere concordă cu rezultatele cercetărilor experimentale efectuate de A. L. Hodgkin și R. D. Keynes în 1955 cu privire la efluxul ionilor de sodiu din axonii giganți vii de *Sepia* și este confirmată de cercetările noastre efectuate pe țesutul foliar viu al plantulelor de porumb. Mai mult, pe baza teoriei biostructurii am putut stabili atît legea după care se desfășoară efluxul ionilor de sodiu din axoni, cît și cantitatea de apă ce se eliberează din biostructura axonilor în prezența inhibitorilor menționați. Aceste fapte dovedesc existența biostructurii în protoplasma celulelor vii, arată că menținerea integrității acestei biostructuri necesită un aport de energie metabolică și confirmă ideea că apa se găsește în celulele vii sub trei forme : liberă, legată de coloizi și asimilată în biostructură.

Conform teoriilor admise în prezent, în celulele vii apa se află sub două forme : apa liberă (A_1), în care sînt dizolvate diferite substanțe și care este reprezentată mai ales prin apa lichidului vacuolar, și apa legată (A_2), care nu are însușiri de solvent și este reprezentată mai ales de apa cuprinsă în coloizii hidrofili și în diferite formațiuni structurale ale celulelor [1], [2]. Se mai consideră că moartea celulelor nu este însoțită de vreo schimbare a raporturilor dintre cele două forme menționate ale apei.

Altfel se prezintă problema apei celulare în cadrul teoriei biostructurii [3], [4]. Conform acestei teorii, celulele vii conțin relativ puțină apă liberă ($a_1 < A_1$), deoarece majoritatea apei ($a_3 = A_1 - a_1$), integrată în biostructură (apa biostructurală sau asimilată), se eliberează numai o dată cu moartea, cînd biostructura se destramă [5]. Prin urmare, în celulele vii apa se află sub trei forme principale : apa liberă (a_1), apa legată ($a_2 = A_2$) și apa asimilată (a_3), iar în celulele moarte sub două forme : apa liberă ($a_1 + a_3 = A_1$) și apa legată ($a_2 = A_2$). Astfel, datorită destrămării biostructurii, moartea celulelor este însoțită de schimbarea raporturilor dintre diferitele forme ale apei celulare. Subliniem că biostructura nu este reprezentată de structura morfologică cunoscută a celulelor vii,

deoarece formaţiunile intracelulare nu numai că nu se destramă o dată cu moartea celulelor, dar înseşi metodele de izolare a lor implică omorîrea materialului biologic respectiv.

Menţinerea integrităţii biostructurii necesită un anumit aport de energie provenită din metabolism [3], [4]. În consecinţă, scăderea intensităţii metabolismului ar trebui să ducă la o labilizare a biostructurii şi la eliminarea parţială a apei asimilate, precum şi a altor componente. Această concluzie a fost formulată pe baza unor consideraţii teoretice acum patru ani [6], cînd nu dispuneam încă de metode de cercetare experimentală în acest domeniu. Or, dacă concluzia este justă, ar trebui ca inhibitorii metabolici, ca dinitrofenolul, azida de sodiu, arsenitul de sodiu şi alţii, administraţi în doze nemortale, să producă în materialul biologic viu, independent de natura şi proveniența sa, destrămarea parţială a biostructurii, cu eliberarea apei şi a altor componente. Un astfel de efect al inhibitorilor metabolici nu a fost cunoscut şi nici nu putea fi prevăzut pe baza concepţiilor admise pînă acum relativ la alcătuirea celulelor vii. De aceea, punerea lui în evidenţă prin mijloace experimentale ar dovedi justeţea teoriei biostructurii şi ar demonstra existenţa acestei structuri în protoplasma celulelor vii.

Pentru punerea în evidenţă a efectului menţionat se poate recurge la o cale indirectă şi la o cale directă.

Calea indirectă ar consta din reexaminarea, de pe poziţiile teoriei biostructurii, a rezultatelor experimentale obţinute de diferiţi cercetători, care, urmărind dezlegarea cu totul a altor probleme, au tratat material biologic viu cu doze nemortale de inhibitori metabolici. Dacă teoria biostructurii este justă, ar trebui ca aceste rezultate să satisfacă două condiţii :

1) interpretarea lor prin prisma teoriei biostructurii să ducă la concluzia că inhibitorii metabolici măresc proporţia de apă liberă în materialul biologic pe care s-a experimentat ;

2) analiza lor să permită demonstrarea superiorităţii concluziei de mai sus faţă de concluzia la care autorii cercetărilor respective au ajuns pe baza altor concepţii teoretice.

În acest cadru am examinat lucrarea *Active transport of cations în gigant axons from Sepia and Loligo*, publicată de A. L. Hodgkin şi R. D. Keynes în 1955 [7], în care s-a urmărit acţiunea unor inhibitori metabolici asupra axonilor vii, deşi în locul acesteia se putea recurge la oricare alta din numeroasele lucrări publicate în acest domeniu.

Calea directă ar consta în măsurarea, cu ajutorul unor metode adecvate, a cantităţii de apă care se eliberează în materialul biologic viu sub acţiunea inhibitorilor amintiţi. Cum dispunem de o metodă [5] aplicabilă mai ales la materialul vegetal, am cercetat cu ajutorul ei acţiunea unor astfel de inhibitori asupra ţesutului foliar al plantulelor de porumb. Dacă teoria biostructurii este justă, ar trebui ca rezultatele obţinute să fie concordante cu cerinţele acestei teorii.

ACŢIUNEA DINITROFENOLULUI AZIDEI DE SODIU ŞI CIANURII DE SODIU ASUPRA AXONILOR DE *SEPIA*

Cercetînd efluxul ionilor de sodiu din axonii giganţi de *Sepia*, încărcaţi întîi cu sodiu marcat şi introduşi apoi în apă de mare, A. L. Hodgkin şi R. D. Keynes au constatat că sub acţiunea inhibitorilor metabolici intensitatea acestui eflux scade, dar revine la nivelul său iniţial după îndepărtarea inhibitorilor din axon (fig. 1).

a) Bazaţi pe *teoria membranei*, autorii menţionaţi au interpretat acest fapt experimental în modul următor:

Conform teoriei membranei, concentraţia ionilor de sodiu în axoni ($[Na]_m$), definită prin raportul dintre cantităţile de sodiu (Na) şi de apă liberă (A_1) aflate în axoplasmă:

$$[Na]_m = \frac{Na}{A_1}, \tag{1}$$

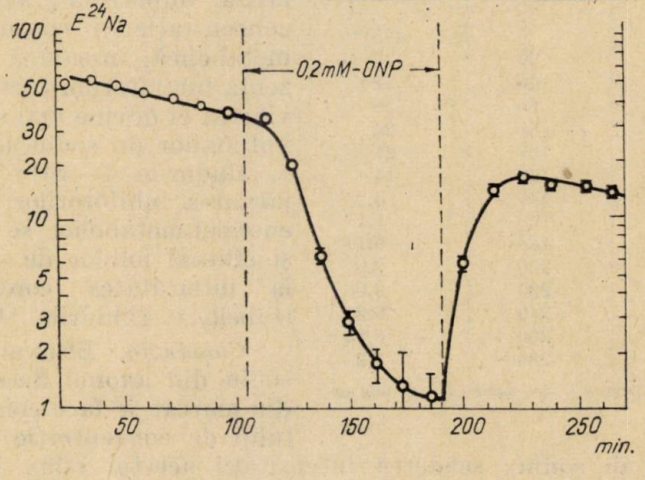


Fig. 1. — Efluxul sodiului marcat din axonul de *Sepia* în cursul tratamentului cu dinitrofenol. La începutul şi la sfîrşitul experienţei, axonul era în apă de mare artificială. Abscisa: timpul de la sfîrşitul stimulării în apa de mare cu ^{24}Na. Ordonata: ritmul cu care ^{24}Na părăseşte axonul. Liniile verticale: $\pm 2 \cdot SE$ (eroare standard). Temperatura 18°C (după A. L. Hodgkin şi R. D. Keynes, [7], p. 34).

În această figură, curba de scădere exponenţială a efluxului sodiului marcat este prezentată în scara logaritmică, iar din această curbă se calcula efluxul sodiului marcat şi se exprima în pM/cm^2 s ([7], p. 36, tab. 3, col. 4), datele obţinute fiind trecute în tabela 1, coloana 4.

este mai mică decît în apa de mare (40 mM/l faţă de 486 mM/l). Deşi acest gradient de concentraţie provoacă un influx pasiv al ionilor de sodiu, din apa de mare în axon, se constată totuşi că în axonul viu concentraţia ionilor de sodiu nu creşte. De aceea, s-a admis că membranele axonului viu compensează influxul menţionat, expulzînd din axon ioni de sodiu împotriva gradientului de concentraţie. Mecanismul ipotetic care ar realiza acest eflux activ, menţinînd în axoplasmă concentraţia constantă şi scăzută a ionilor de sodiu, a fost numit „pompa de sodiu".

Stimularea electrică a axonului introdus în apă de mare cu sodiu marcat măreşte permeabilitatea membranelor acestuia şi intensifică influxul pasiv, ceea ce duce la acumularea ionilor de sodiu în axoplasmă. După stimulare, concentraţia acestor ioni în axon (90 mM/l), deşi depăşeşte pe cea iniţială (40 mM/l), rămîne totuşi inferioară celei din apa de mare (486 mM/l).

Tabela 1

Efluxul sodiului marcat (*E) din axonul de *Sepia*, încărcat intîi cu sodiu marcat şi introdus apoi în apa de mare**
(după A. L. Hodgkin şi R. D. Keynes, 1955, p. 36)

Nr. crt.	DNP 0,2 mM	*t* min	*E* * pM/cm² s măsurat
1	2	3	4
1	—	0	(43)*
2	—	20	37
3	—	40	32
4	—	60	28
5	—	80	24
6	—	100	21
7	+	120	14,4
8	+	140	3,2
9	+	160	1,1
10	+	180	0,74
11	—	200	2,9
12	—	220	9,0
13	—	240	9,2
14	—	260	8,15
15	—	280	7,2

*Valoarea 43 pM/cm² s a fost dedusă de noi prin extrapolare ([8], 220).

Cu toate acestea, axonii încărcaţi cu sodiu marcat prezintă un intens eflux al ionilor de sodiu, datorită căruia concentraţia acestor ioni în axoplasmă tinde să revină la valoarea normală (40 mM/l) (tabela 1, rîndurile 1—6).

Cum pompa de sodiu acţionează împotriva gradientului de concentraţie şi consumă energie metabolică, înseamnă că în prezenţa inhibitorilor metabolici activitatea ei devine mai slabă şi efluxul ionilor de sodiu scade (tabela 1, rîndurile 7—10); după îndepărtarea inhibitorilor, producerea energiei metabolice se restabileşte şi efluxul ionilor de sodiu revine la intensitatea corespunzătoare (tabela 1, rîndurile 11—15).

Concluzia. Efluxul ionilor de sodiu din axonul încărcat cu sodiu marcat se face contra gradientului de concentraţie şi se datoreşte pompei de sodiu; scăderea intensităţii acestui eflux în prezenţa inhibitorilor metabolici este cauzată de încetinirea activităţii pompei, datorită reducerii aportului de energie metabolică.

b) Examinînd aceleaşi rezultate experimentale prin prisma *teoriei biostructurii*, ajungem la o altă interpretare.

Conform acestei teorii, biostructura nu conţine sodiu decît, poate, în cantitate relativ mică, iar concentraţia lui în axoplasmă ($[Na]_b$), definită prin raportul dintre cantitatea de ioni de sodiu (Na) şi cea de apă liberă (a_1), în care sînt dizolvaţi, este egală cu aceea din apa de mare (486 mM/l):

$$[Na]_b = \frac{Na}{a_1}. \qquad (2)$$

Stimularea electrică a axonului introdus în apa de mare ce conţine sodiu marcat duce la destrămarea parţială a biostructurii şi la eliberarea unei părţi din apa integrată în biostructură (apa asimilată). Apa eliberată se adaugă la apa liberă a axonului în care sînt dizolvaţi ionii de sodiu, concentraţia acestora scade şi devine mai mică decît în apa de mare. Astfel se creează un gradient de concentraţie care face ca sodiul din apa de mare să pătrundă în axon. Îndată după stimulare, biostructura se reface, apa care a fost eliberată se reintegrează în biostructură şi astfel cantitatea de apă liberă din axon revine la normal. Cum în axon se găseşte acum o cantitate de sodiu mai mare decît înainte de stimulare, concentraţia acestuia creşte (996 mM/l), depăşind-o pe aceea din apa de mare (486 mM/l). Astfel se creează un gradient de concentraţie care determină efluxul ionilor de sodiu din axoni.

În cazul cînd acest eflux este un eflux de gradient, el ar trebui să urmeze legea difuziei a lui Fick.

Or, într-o altă lucrare [8] am arătat că el se produce conform ecuației de difuzie :

$$x = (A - c_0) - 10^{\log(A-c_0) - Kt}, \quad (3)$$

dedusă din legea lui Fick, în care : $a = 371$ nM/nl ; $c_0 = 181$ nM/373 nL ; $K = 0{,}00461$, iar x reprezintă cantitatea de sodiu, exprimată în nM, care părăsește axonul în decursul timpului t, exprimat în minute. Într-adevăr, se constată din tabela 2 că valorile x calculate concordă cu cele deduse din datele experimentale.

Tabela 2

Efluxul de gradient al sodiului total (x) din axonul de *Sepia*, încărcat întîi cu sodiu marcat și introdus apoi în apa de mare

Nr. crt.	t min	x nM/cm² dedus din datele experimentale	x nM/cm² calculat cu ajutorul ecuației de difuzie (3)
1	2	3	4
1	0	—	—
2	20	36	36,3
3	40	66	65,7
4	60	90	89,5
5	80	109	108,7
6	100	124	124,3

Cum menținerea integrității biostructurii necesită un consum de energie metabolică, înseamnă că sub acțiunea inhibitorilor metabolici biostructura se destramă parțial și eliberează o parte din apa asimilată. Apa eliberată diluează soluția intraplasmatică a sodiului, micșorează gradientul de concentrație dintre axon și apa de mare și astfel efluxul respectiv scade. Se înțelege că după îndepărtarea inhibitorilor din axon producerea energiei metabolice revine la normal, apa eliberată se reintegrează în biostructură, concentrația sodiului în apa liberă a axonului crește și efluxul se intensifică.

Or, într-o altă lucrare [9] am arătat că modificările concentrației ionilor de sodiu în apa liberă a axoplasmei, provocate de dinitrofenol (fig. 2), precum și cantitățile de apă eliberate din biostructura axoplasmei în prezența acestui inhibitor metabolic (fig. 3) pot fi calculate cu ajutorul ecuației de difuzie (3) și al relațiilor care exprimă interdependența dintre diferitele fluxuri ionice la axon, printre care figurează și relația :

$$[\mathrm{Na}^*]_{i+1} = [\mathrm{Na}^*]_i \frac{[\mathrm{Na}]_{i+1} - \mathrm{I}_i}{[\mathrm{Na}]_i}. \quad (4)$$

În această relație, $[\mathrm{Na}^*]_i$ și $[\mathrm{Na}^*]_{i+1}$, respectiv $[\mathrm{Na}]_i$ și $[\mathrm{Na}]_{i+1}$ reprezintă concentrațiile sodiului marcat și ale sodiului total în diferitele perioade ale experienței, iar I_i reprezintă influxul de sodiu din apa de mare în axon, calculat pentru începutul fiecărei perioade, conform indicațiilor date în lucrarea [8].

Concluzia. Efluxul ionilor de sodiu din axonul încărcat cu sodiu marcat este un eflux de difuzie și se datorește gradientului de concentrație al acestor ioni între axon și apa de mare ; scăderea intensității acestui eflux în prezența inhibitorilor metabolici se datorește micșorării concentrației ionilor de sodiu în apa liberă a axoplasmei, provocată de apa ce se eliberează din biostructura axoplasmei în urma reducerii aportului de energie metabolică.

c) Interpretarea prin prisma teoriei biostructurii a rezultatelor experimentale analizate arată că inhibitorii metabolici măresc proporția

apei libere în axonii giganți de *Sepia* încărcați cu sodiu marcat. Prin urmare, concluzia de la punctul b satisface condiția 1.

d) Analiza comparativă a interpretărilor și concluziilor de la punctele a și b arată că teoria membranei nu precizează legea după care se produce

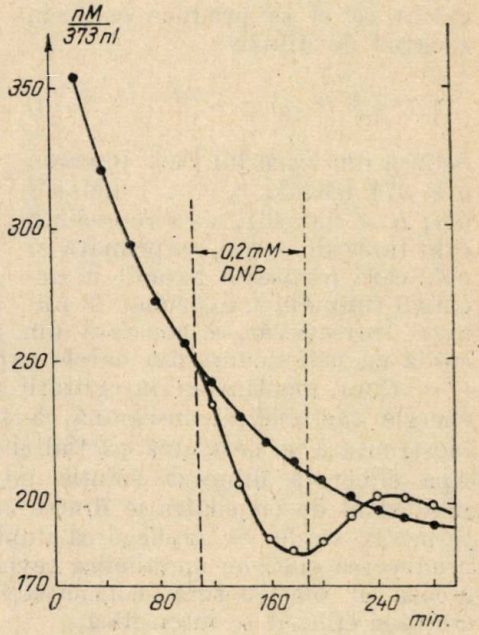


Fig. 2. — Variația concentrației sodiului total [Na] în apa liberă a axoplasmei în decursul efluxului de sodiu din axonul de *Sepia* încărcat prin stimulare electrică cu ^{24}Na. Abscisa : timpul în minute. Ordonata : concentrația exprimată în nM/373 nl a sodiului total în apa liberă a axoplasmei. Puncte : concentrațiile medii ale sodiului total, calculate cu ajutorul ecuației de difuzie (3) pentru cazul cînd dinitrofenolul nu ar fi fost aplicat. Cercuțe : concentrațiile medii ale sodiului total în axonul tratat cu dinitrofenol, calculate pe baza datelor cuprinse în tabela 1, coloana 4 [9].

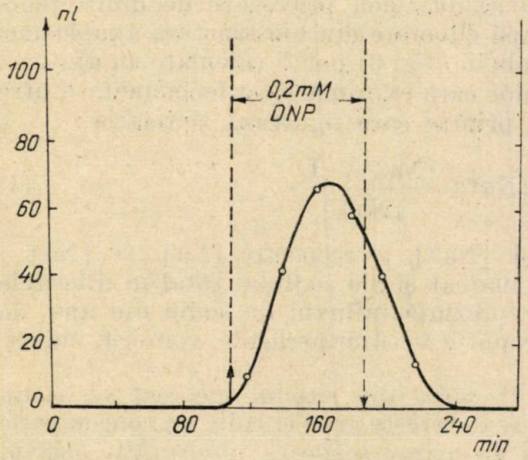


Fig. 3. — Cantitatea de apă (exprimată în nl în raport cu 373 nl apă liberă (a_1) din axoplasmă) ce se eliberează din biostructura axonului de *Sepia* sub acțiunea dinitrofenolului. Abscisa : timpul în minute. Ordonata : cantitatea apei (*nl*) eliberată din biostructură.

efluxul ionilor de sodiu din axon și, în consecință, se rezumă la aprecieri de ordin calitativ cu privire la fenomenele care se produc în axon în prezența inhibitorilor metabolici, pe cînd teoria biostructurii indică legea și permite evaluarea cantitativă a fenomenelor menționate. Aceasta dovedește superioritatea interpretărilor bazate pe teoria biostructurii și demonstrează că concluzia de la punctul b satisface condiția 2.

ACŢIUNEA DINITROFENOLULUI ŞI AZIDEI DE SODIU ASUPRA FRUNZELOR DE PORUMB

Cercetările experimentale în acest domeniu, efectuate în colaborare cu V. Frunzeti [10], se bazează pe unele investigaţii anterioare cu privire la starea apei în protoplasma ţesutului foliar al diferitelor plante şi la originea sucurilor vegetale [5].

Se ştie că frunzele proaspete dau prin stoarcere sucul vacuolar şi că reziduul dă sucul plasmatic dacă înainte de stoarcere este omorît prin îngheţare. Spre deosebire de alţi autori [11], [12], considerăm că sucul plasmatic este alcătuit din apă şi substanţe hidrosolubile provenite din biostructura care a existat în reziduul proaspăt, încă viu, dar s-a destrămat o dată cu omorîrea acestuia [5]. Or, dacă în doze nemortale inhibitorii metabolici provoacă destrămarea parţială a biostructurii, ar fi de aşteptat ca :

1) frunzele tratate cu inhibitori metabolici să dea mai mult suc decît frunzele-martor, deoarece la sucul lor vacuolar s-ar adăuga şi o parte din apa provenită din destrămarea parţială a biostructurii;

2) reziduul după stoarcerea frunzelor tratate cu inhibitori să dea după omorîre mai puţin suc decît reziduul de la frunzele-martor, deoarece o parte din apa biostructurii a fost eliberată o dată cu sucul vacuolar;

3) sucul obţinut din frunzele tratate cu inhibitori metabolici să conţină substanţe hidrosolubile într-o cantitate mai mare decît sucul vacuolar obţinut din frunzele-martor, deoarece la substanţele hidrosolubile ale sucului vacuolar s-ar adăuga şi substanţele hidrosolubile provenite din destrămarea parţială a biostructurii;

4) sucul obţinut din reziduul omorît de la frunzele tratate cu inhibitori să conţină componente hidrosolubile într-o cantitate mai mică decît sucul plasmatic obţinut din reziduul omorît al frunzelor-martor, deoarece o parte din componentele hidrosolubile ale biostructurii a fost eliminată o dată cu sucul vacuolar;

5) frunzele tratate cu substanţe care nu se încadrează în categoria inhibitorilor metabolici şi care nu exercită asupra biostructurii acţiuni iritante, precum şi reziduurile omorîte ale acestor frunze să dea sucuri cantitativ şi calitativ corespunzătoare celor ce se obţin din frunzele şi reziduurile-martor.

Toate aceste prevederi au fost confirmate de cercetări efectuate pe frunze de plantule de porumb în condiţiile descrise în lucrarea [10]. Într-adevăr, unele rezultate obţinute prin măsurarea cantităţii şi a concentraţiei sucurilor stoarse atît din frunze proaspete, tratate fie cu apă (martor), fie cu dinitrofenol, fie cu azidă de sodiu, cît şi din reziduurile acestor frunze, după prealabila omorîre prin îngheţare cu zăpadă carbonică, sînt prezentate în figurile 4 şi 5.

Se constată că frunzele tratate cu dinitrofenol sau cu azidă de sodiu dau o cantitate mai mare de suc decît frunzele-martor, precum şi că reziduurile de la frunzele tratate cu inhibitori dau, după omorîre, o cantitate de suc mai mică decît reziduul-martor. Aceste fapte concordă cu prevederile 1 şi 2.

Se mai constată că sucurile obținute din frunzele tratate cu inhibitori conțin substanțe hidrosolubile, exprimate global în grame zaharoză, în cantitate mult mai mare decît sucul vacuolar provenit de la frunzele-

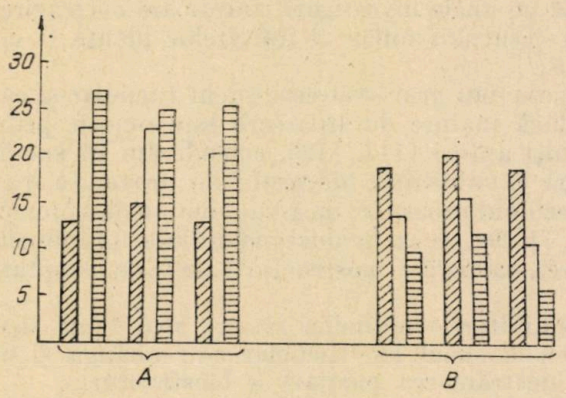


Fig. 4. — Rezultatele a trei experiențe complete.
A : Cantitatea (ml) sucului vacuolar stors la 150 atm din frunzele plantulelor de porumb (50 g), tratate în prealabil timp de 24 de ore cu apă (martor) și cu soluții de dinitrofenol (10^{-3} mM/l) și de azidă de sodiu (10^{-2} mM/l) ; B : Cantitatea (ml) sucului plasmatic stors la aceeași presiune din reziduurile respective, după prealabilă înghețare cu zăpadă carbonică sau aer lichid.
Coloanele haşurate pieziş : frunzele tratate cu apă (martor) ; coloanele albe : frunzele tratate cu dinitrofenol ; coloanele haşurate orizontal : frunzele tratate cu azidă de sodiu.
Primul grup, format din trei coloane atît din seria A, cît și din seria B, exprimă rezultatele primei experiențe complete ; rezultatele experienței a doua sînt exprimate prin grupurile de coloane din mijlocul seriilor A și B ; rezultatele experienței a treia sînt exprimate prin ultimele grupuri de coloane din ambele serii.

martor, precum și că la sucurile obținute din reziduurile omorîte ale frunzelor tratate cu inhibitori situația este inversă : cantitatea substanțelor hidrosolubile conținute în ele este mai mică decît în sucul plasmatic obținut de la reziduul-martor. Aceste fapte concordă cu prevederile 3 și 4.

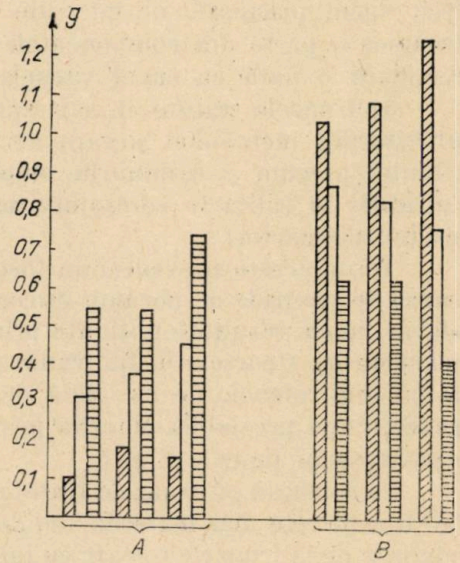


Fig. 5. — Rezultatele a trei experiențe complete. Cantitatea substanțelor hidrosolubile exprimată convențional în grame zaharoză, conținută atît în sucul vacuolar stors din frunzele plantulelor de porumb (50 g) tratate cu apă (martor) și cu soluții de dinitrofenol și de azidă de sodiu, cît și în sucul plasmatic stors din reziduurile respective. Condițiile experimentale, notația și semnificația reprezentărilor grafice sînt aceleași ca și în cazul figurii 4.

Rezultate similare au fost obținute cercetînd repartiția în sucuri a ionilor de potasiu și calciu, precum și a fosforului anorganic.

În fine, s-a constatat că, în cazul înlocuirii inhibitorilor metabolici prin zaharoză sau alanină, cantitatea şi concentraţia sucurilor provenite din frunzele şi reziduurile respective sînt aceleaşi ca şi ale sucurilor-martor, ceea ce concordă cu prevederea 5.

Astfel, experienţa confirmă ideea că inhibitorii metabolici, în doze nemortale, provoacă o destrămare parţială a biostructurii frunzelor plantulelor de porumb.

CONCLUZII

Cercetarea acţiunii pe care inhibitorii metabolici o exercită atît asupra axonilor vii de *Sepia*, cît şi asupra ţesutului foliar viu de porumb duce la acelaşi rezultat, arătînd că administrarea în doze nemortale a acestor inhibitori provoacă destrămarea parţială a biostructurii, cu eliberarea din ea a apei şi a altor componente biostructurale.

Creşterea cantităţii de apă liberă din celulele vii sub acţiunea inhibitorilor metabolici, precum şi scăderea cantităţii ei după încetarea acţiunii menţionate determină modificări corespunzătoare ale concentraţiei diferitelor substanţe dizolvate în această apă. Este evident că astfel de fenomene pot avea un rol important în desfăşurarea biochimismului celulelor vii.

Punerea în evidenţă a acestui efect, necunoscut pînă acum, dar prevăzut de teoria noastră, demonstrează existenţa biostructurii în protoplasma celulelor vii şi confirmă necesitatea unui aport de energie pentru menţinerea integrităţii acestei structuri, ceea ce sprijină teoria biostructurii în ansamblul ei.

Prezentată la redacţie la 15 ianuarie 1969

Institutul de biochimie al Academiei Republicii Socialiste România şi Universitatea Bucureşti, Facultatea de biologie, Catedra de biochimie

BIBLIOGRAFIE

1. P. J. Kramer, *Bound water*, în *W. Ruhland's Handbuch der Pflanzenphysiologie*, Springer Verlag, Berlin — Göttingen — Heidelberg, 1955, **I**, 223.
2. D. A. Sabinin, *Fiziologiceskie osnovi pitania rastenii*, Izdatelstvo Akademii Nauk SSSR, Moscova, 1955, 81—85.
3. E. Macovschi, Rev. Chim., **4**, 11 (1959).
4. E. Macovschi, Rev. roum. biochim., **2**, 189 (1965).
5. E. Macovschi, I. Marineanu, Rev. roum. Biochim., **4**, 235 (1967).
6. E. Macovschi, Rev. roum. Biochim., **2**, 285 (1965).
7. A. L. Hodgkin, R. D. Keynes, J. Physiol., Lond., **128**, 28 (1955).
8. E. Macovschi, St. cerc. Biochim., **11**, 213 (1968).
9. E. Macovschi, St. cerc. Biochim., **12**, (sub tipar) (1969).
10. E. Macovschi, V. Frunzeti, St. cerc. biochim., **12**, (sub tipar) (1969).
11. T. Mason, E. Phillis, Ann. Bot. N. S., **3**, 531 (1959).
12. J. A. Medvedev, N. N. Zabolotnîi, Sen Tzian-Sea, Mo Si-Mu, E. G. Davîdova, E. P. Davîdov, Biohimiia, **25**, 1001 (1960).

THE PARTIAL RELEASE OF BIOSTRUCTURE WATER IN THE PRESENCE OF METABOLIC INHIBITORS

SUMMARY

According to our theory, part of the matter constituting living protoplasm is integrated into a quite particular structure, called biostructure, the integrity of which is maintained by metabolic energy supply. At the moment of protoplasm death biostructure breaks up. It follows that metabolic inhibitors (dinitrophenol, sodium azide etc.) introduced into any living material would have an effect of partial breakdown upon biostructure, with the concomitant release of water and other components it is made up of. This prediction is consistent with A. L. Hodgkin's and R. D. Keynes' experimental findings relevant to sodium ion effluxes from Sepia giant axons; it is also confirmed by our own investigations on living leaf tissue of maize seedlings. Moreover, on the ground of biostructure theory we were able to establish both the law which governs sodium ion effluxes from axons and the water amounts which are released from axon biostructure in the presence of inhibitors. These facts demonstrate the existence of biostructure within living protoplasm, show that the maintenance of biostructure integrity requires metabolic energy supply, also confirming the view that water occurs in living cells under three forms: free water, coloid-bound water and biostructure-assimilated water.

ST. CERC. BIOCHIM., 12, 2, 115—119 (1969)

RIBONUCLEAZE ÎN SUCURILE FRUNZELOR DE PORUMB (CONSIDERAȚII ÎN LUMINA TEORIEI BIOSTRUCTURII)

E. MACOVSCHI și VIORICA FRUNZETI-ELEFTERESCU

Rezumat. S-a urmărit activitatea ribonucleazică la sucurile stoarse din frunzele plantulelor de porumb în diferite condiții experimentale. S-a constatat că atît sucul vacuolar, cît și cel plasmatic prezintă activitate ribonucleazică, iar în sucul obținut din frunzele tratate cu dinitrofenol activitatea ribonucleazică este mai intensă decît în sucul vacuolar normal. Din aceste rezultate s-a putut trage concluzia că ribonucleaza din țesutul foliar de porumb se găsește atît în biostructură, cît și în materia necuprinsă în ea și că sub influența dinitrofenolului o parte din ribonucleaza biostructurală este eliberată.

Ribonucleazele sînt răspîndite în plante [1], [2], iar activitatea lor s-a cercetat mai ales în omogenate [3], [4] și în extracte vegetale [5], [6]. Prezența lor în sucurile stoarse din frunze nu a fost încă semnalată. Dar, după cum am arătat într-o lucrare precedentă [7], cercetarea activității enzimatice a sucurilor obținute din frunze poate să ne dea unele indicații cu privire la localizarea enzimelor respective în celulele țesutului foliar viu.

În acest scop ar urma să se examineze, sub aspectul activității ribonucleazice, pe de o parte sucul vacuolar obținut prin stoarcerea frunzelor proaspete, pe de alta sucul plasmatic stors din reziduul de presă al acestora după prealabila lui omorîre prin înghețare cu azot lichid, adică după destrămarea biostructurii [8]. Activitatea ribonucleazică a sucului vacuolar indică prezența acestor enzime în lichidul vacuolar al celulelor țesutului foliar, iar aceea a sucului plasmatic indică prezența acestor enzime în biostructură.

Lucrarea de față prezintă rezultatele acestor încercări, în cadrul cărora, pentru a obține informații suplimentare cu privire la localizarea ribonucleazelor, am apelat și la ajutorul unor inhibitori metabolici apți să provoace o destrămare parțială a biostructurii cu punere în libertate de apă, diferiți ioni și alte substanțe [9].

MATERIAL ȘI METODĂ

Cercetările au fost efectuate pe frunze de plantule de porumb (hibrid simplu 301, recolta 1967) în vîrstă de 12—16 zile.

Pentru obținerea sucului vacuolar, 50 g frunze tăiate de la colet se storceau într-o presă hidraulică de laborator, tip Hafico, model 2 litri, prevăzută cu dispozitivul special pentru cantități mici de material vegetal. Presiunea se ridica pînă la 150 atm și se menținea pînă cînd materialul înceta să mai cedeze suc.

Pentru obținerea sucului plasmatic total, reziduul după îndepărtarea din frunze a sucului vacuolar se scotea din presă, se trata cu azot lichid, iar după dezghețare se storcea din nou la aceeași presiune.

S-a recurs și la o stoarcere fracționată a sucului, ținînd seamă că unul și același reziduu stors la diferite intervale de timp dă fracțiuni ale sucului plasmatic provenite din destrămarea unor regiuni tot mai adînci ale biostructurii [7]. În acest scop, reziduul din presă după stoarcerea sucului vacuolar se menținea timp de 2—3 zile la temperatura de +4°C (frigider) în borcan ermetic închis și se storcea o dată la fiecare 24 de ore. Astfel se obțineau 2—3 fracțiuni succesive ale sucului plasmatic.

Pentru a constata dacă inhibitorii metabolici produc eliberarea ribonucleazelor din biostructură, plantulele de porumb tăiate de la colet și legate în mănunchiuri de cîte 50 g se introduceau cu tulpinile lor în soluții de dinitrofenol 10^{-3} M. După 24 de ore, ele se scoteau din soluție, capetele care fuseseră cufundate în soluție se spălau cu apă, se uscau cu hîrtie de filtru și apoi întregul material se storcea la presă în modul indicat mai sus; plantulele-martor se introduceau în apă distilată și se prelucrau în același mod.

În toate cazurile, sucurile, măsurate cu cilindrul gradat, se centrifugau la 12 000 g timp de 25 min, iar activitatea ribonucleazică se determina ținînd seama de indicațiile date de Yasuhiro Anraku și Denichi Mizuno [10]. În acest scop, sucul centrifugat se dilua cu apă distilată în proporție de 1 : 1, apoi la 0,20 ml suc diluat se adăugau 0,30 ml tampon acid citric (0,1 M), 17,9 ml fosfat disodic (0,2 M), 32,1 ml adusă la 100 ml (pH 6), 0,10 ml mM EDTA și 0,10 ml apă. Amestecul se încălzea la 37°C, i se adăuga 0,30 ml de ARN 1% (acid ribonucleic purum, polim Serva), iar după 60 min reacția se oprea cu 0,25 ml soluție de acetat de uranil (0,19 g acetat de uranil dizolvat în 8 ml acid percloric 70%, totul fiind adus la 25 ml cu apă distilată). Probele se mențineau jumătate de oră pe gheață, apoi se centrifugau la 3 000 rot/min; din supernatant se preluau 0,20 ml, care se adăugau la 10,0 ml apă distilată. Probele se citeau la spectrofotometrul VSU 1, cuva 0,5, 260 mμ. Paralel se efectuau în aceleași condiții probe-martor cu enzima inactivată cu acetat de uranil.

Rezultatele sînt exprimate în unități de ribonuclează, raportate atît la 1 ml, cît și la întreaga cantitate de suc obținută, socotind ca unitate de ribonuclează acea cantitate de enzimă care în timp de o oră produce o extincție de 1,0 la spectrofotometrul amintit; această definiție a unității de ribonuclează este analogă celor date de Yasuhiro Anraku și Denichi Mizuno [10] și de Masachiko Irie [11].

Menționăm că dinitrofenolul nu modifică activitatea ribonucleazelor în concentrația în care a fost folosit. Într-adevăr, experiențele au arătat că sucul centrifugat, diluat în proporție de 1 : 1 cu o soluție de dinitrofenol 10^{-3} M și prelucrat apoi în modul arătat, dă pentru activitatea ribonucleazică practic aceleași valori ca și în cazul aceluiași suc diluat cu apă distilată în aceeași proporție.

REZULTATELE OBȚINUTE ȘI INTERPRETAREA LOR

Unele rezultate obținute prin determinarea activității ribonucleazice în sucul vacuolar și în cel plasmatic sînt trecute în tabela 1.

Se constată că ribonucleazele sînt prezente atît în sucul vacuolar, cît și în cel plasmatic, ceea ce înseamnă că aceste enzime se găsesc atît în

lichidul intracelular, cît și în biostructura frunzelor de porumb. Faptul că atît activitatea enzimatică a sucului plasmatic, raportată la ml, cît și cea corespunzătoare cantității totale de suc plasmatic o depășesc pe aceea a

Tabela 1

Cantitatea (ml) de suc vacuolar și plasmatic obținută prin stoarcerea la 150 atm a frunzelor de porumb (probe de cîte 50 g), respectiv din reziduul acestora omorît cu azot lichid, precum și activitatea ribonucleazică a acestor sucuri, exprimată în unități de ribonucleză (URN)

Nr. crt.	Data 1968	Suc vacuolar			Suc plasmatic		
		ml	URN/ml	URN/suc total	ml	URN/ml	URN/suc total
1	2	3	4	5	6	7	8
1	7. V	17	25±4	318±51	21	21±3	441±63
2	30. V	15	29±2	429±30	15	38±2	570±30
3	4. VII	14	27±3	385±43	19	40±3	750±56
4	26. VII	18	24±2	441±37	17	41±3	697±51

sucului vacuolar arată că biostructura conține mai multă ribonucleză decît lichidul vacuolar.

Pe de altă parte, rezultatele prezentate în tabela 2 arată că activitatea ribonucleazică nu este uniform repartizată în toate fracțiunile

Tabela 2

Cantitatea (ml) sucului vacuolar și a fracțiunilor de suc plasmatic obținute prin stoarceri succesive la 150 atm a cîte 50 g de frunze de porumb, precum și activitatea ribonucleazică a acestor sucuri, exprimată în unități de ribonucleză (URN) : A, B = experiențe efectuate pe două loturi diferite de plante

Nr. crt.	Data 1968	Natura sucului	Varianta	Suc ml	URN/ml	URN/suc total
1	2	3	4	5	6	7
1	11.VI	vacuolar	A	32	58±5	1872±162
			B	34	58±5	1975±169
2	12.VI	plasmatic fr. 1	A	22	55±4	1223± 89
			B	26	51±6	1331±157
3	13.VI	plasmatic fr. 2	A	15	118±8	1770±120
			B	13	113±7	1469± 91
4	14.VI	plasmatic fr. 3	A	5	65±4	321± 19
			B	3	67±3	201± 9

succesive ale sucului plasmatic, ci diferă la diversele fracțiuni, valorile maxime înregistrîndu-se în fracțiunea a doua. Aceasta înseamnă că majoritatea enzimei se găsește în acea porțiune a biostructurii, care se destramă

în a doua zi de păstrare. Cît privește activitatea ribonucleazică a sucului vacuolar, datele tabelei 2 le confirmă întru totul pe cele din tabela 1.

Dacă examinăm acum tabela 3, care cuprinde unele rezultate obținute prin determinarea activității ribonucleazice a sucului stors atît din plante tratate cu dinitrofenol, cît și din plantele-martor tratate cu apă, constatăm următoarele: activitatea ribonucleazică raportată la cantitatea totală de suc obținută din plantele tratate o depășește cu 20—40% pe aceea a sucului vacuolar obținut din plante tratate cu apă. Aceasta înseamnă că, în cazul plantelor tratate cu dinitrofenol, la ribonucleaza aflată în sucul vacuolar se mai adaugă o anumită cantitate de enzimă provenită din biostructură; cum însă dinitrofenolul, în concentrația folosită, determină numai o destrămare parțială a biostructurii, înseamnă că surplusul menționat al ribonucleazei provine tocmai din acel strat al biostructurii care se destramă sub acțiunea inhibitorului menționat. De altfel, o constatare asemănătoare facem și în privința apei: după cum rezultă din tabela 3,

Tabela 3

Cantitatea (ml) de suc obținută prin stoarcerea la 150 atm a frunzelor de porumb (probe de cîte 50 g) tratate atît cu apă (martor — M), cît și cu soluție de dinitrofenol (DNP), precum și activitatea ribonucleazică a acestor sucuri, exprimată în unități ribonucleazã (URN). Concentrația soluției de dinitrofenol: 10^{-3} M; durata tratamentului plantelor: 24 de ore la 20—22°C

Nr. crt.	Data 1968	Suc ml		URN/ml		URN/suc total	
		M	DNP	M	DNP	M	DNP
1	2	3	4	5	6	7	8
1	10.VII	13	20	28±2	25±3	370±27	510±61
2	25.VII	25	39	35±1	32±2	887±25	1248±78
3	31.VII	18	37	29±5	17±2	531±92	647±76

cantitatea de suc obținută din plantele tratate cu dinitrofenol o depășește pe aceea a sucului vacuolar obținut din plantele-martor. Se înțelege că surplusul de suc, adică de apă, provine din acel strat al biostructurii care se destramă sub acțiunea inhibitorului folosit. Aceasta concordă cu constatările pe care le-am făcut într-o altă lucrare [7].

CONCLUZII

Atît sucul vacuolar, cît și cel plasmatic obținut din frunzele de porumb prezintă activitate ribonucleazică, iar în sucul obținut din frunzele de porumb tratate cu dinitrofenol activitatea ribonucleazei este mai intensă decît în sucul vacuolar obținut din plantele-martor. Aceasta înseamnă că ribonucleaza din țesutul foliar de porumb se găsește atît în biostructură, cît și în materia necuprinsă în ea și că sub influența dinitrofenolului o parte din ribonucleaza biostructurală este eliberată.

Prezentată la redacție
la 27 ianuarie 1969

*Institutul de biochimie al
Academiei Republicii Socialiste România
și
Catedra de biochimie a
Universității din București*

BIBLIOGRAFIE

1. K. K. Redi, Procedures in nucleic acid research, Ed. G. L. Cantoni et David R. Davies, New York – Londra, 1966, p. 71.
2. Curtis M. Wilson, BBA, **76**, 324 (1963).
3. F. Solymosy, I. Fedocsak, A. Gulyas, G. L. Farkas, L. Ehrenberg, Europ. J. Biochim., **5**, 520 (1966).
4. T. Golaszewski, J. W. Szarkowski, M. Onbach, Acta Soc. Bot. Pol., **XXXVI**, *1*, 199 (1967).
5. G. R. Barker, J. A. Hollinshead, Nature, Lond., **212**, 5065, 926 (1966).
6. Dove D. Levis, Plant Physiol., **42**, *9*, 1176 (1967).
7. E. Macovschi, V. Frunzeti, Rev. roum. Biochim., **5**, *3*, 165 (1968).
8. E. Macovschi, I. Marineanu, Rev. roum. Biochim., **4**, 235 (1967).
9. E. Macovschi, V. Frunzeti, St. cerc. biochim., **12**, *19*, (1969).
10. Yasuhiro Anraku, Denichi Mizuno, J. Biochem., **61**, *1*, 70 (1967).
11. Masachiko Irie, J. Biochem., **62**, *5*, 50 (1967).

RIBONUCLEASES IN MAIZE LEAF SAPS
(CONSIDERATIONS IN THE LIGHT OF THE BIOSTRUCTURAL THEORY)

SUMMARY

Ribonucleasic activity in the saps got from maize young plant leaves was followed in different experimental conditions. We found that both vacuolar and plasmatic saps show ribonucleasic activity ; in the sap obtained from leaves previously treated with dinitrophenol the ribonucleasic activity is more intense than in the vacuolar sap obtained in normal conditions. From these results we could conclude that ribonuclease in the maize leaf tissue exists in biostructure as well as in the matter uncomprised in it, and that dinitrophenol induces a partial releasing of the biostructural ribonuclease.

ST. CERC. BIOCHIM., 12 2, 121–128 (1969)

ACȚIUNEA DIVERȘILOR IONI ASUPRA ACTIVITĂȚII FOSFATAZEI ACIDE DIN PORUMB

VICTORIA ALEXANDRESCU și DOINA POPOV

Rezumat. Activitatea fosfatazei acide nespecifice din formațiunile seminței de porumb în repaus sau după germinație și din frunză a fost analizată în două sisteme tampon: acid succinic-NaOH și acid citric-citrat. Ea prezintă pH-uri optime diferite, cuprinse între 5,2 și 6,7, care pot caracteriza formațiunea și etapa de dezvoltare. În prezența β-glicerofosfatului ca substrat se constată că în sistemul tampon acid succinic-NaOH activitatea fosfatazică este de 1,8—5 ori mai mare decît în sistemul tampon acid citric-citrat, cu o singură excepție, cea din endosperm după germinația seminței. Ionii adăugați mediului de reacție au un efect similar, unitar asupra enzimei din formațiunile aceleiași etape de dezvoltare (formațiunile seminței în repaus, după germinație), dar diferit după perioada de vegetație (sămînță, germinare, frunză).

Fosfataza acidă obținută din diferite plante prezintă comportări diferite față de anionii și cationii adăugați mediului de reacție, fapt care ar pleda pentru diferențe în structura acestei enzime. Astfel, Mayer [1] constată că activitatea fosfatazei acide din soia este inhibată de ionii de F^-, $C_2O_4^{2-}$, Mg^{2+} și Zn^{2+} în tampon acetat-veronal, pH 6, și că tamponul citrat inhibă activitatea enzimei pînă la 70%. El nu a putut obține nici o activare a acestei enzime. Newmark și Wenger [2], lucrînd pe cotiledoane și plante de lupin, observă că Mg^{2+} poate avea o acțiune de activare cu 25% a fosfatazei acide respective. Cercetările lui Shaw [3] asupra enzimei din frunzele de tutun stabilesc că ionii de Mg^{2+} și Mn^{2+} nu au nici o acțiune, pe cînd ionii de Zn^{2+} și MoO_4^{2-} scad activitatea la aproximativ 10—40%.

În lucrarea de față am caracterizat fosfataza acidă din axul embrionar, scutelul și endospermul seminței de porumb înainte și după 4—5 zile de germinație, precum și din frunze în etapa de plantă cu 3—4 frunze, prin stabilirea pH-ului optim de activitate și prin comportarea ei față de unii anioni și cationi.

MATERIAL ȘI METODĂ

S-a lucrat pe semințe de porumb HD-333, puse la dispoziție de Institutul de cercetări pentru cereale și plante tehnice Fundulea.

Axul embrionar, scutelul și endospermul semințelor în stare de repaus s-au separat manual și s-au mojarat fin în tampon TRIS-HCl

0,04 M, care conţinea NaCl 0,35 M, pH = 8,8, în raporturile de extracţie de 1 g/5 ml, 1 g/4 ml şi 1 g/2 ml. Formaţiunile izolate din seminţe după 4—5 zile de germinaţie s-au mojarat în acelaşi tampon, în raportul 1 g/2 ml pentru axul embrionar, 1 g/8 ml pentru scutel şi 1 g/1,5 ml pentru endosperm; frunzele recoltate de la plante de porumb în etapa de 3—4 frunze s-au trecut printr-o moară de laborator şi s-au extras în tamponul de mai sus, în raportul 5 g/l ml, timp de 1 oră la temperatura camerei, apoi s-au stors prin două straturi de tifon (după caz) şi s-au centrifugat 20 min la 4 250 g. Supernatantul obţinut s-a dializat pînă a doua zi faţă de apă distilată şi s-a folosit pentru dozarea activităţii fosfatazei acide.

Dozarea activităţii fosfatazei s-a făcut după modificarea Portocală — Popa [4] a metodei Fiske-SubbaRow, avînd ca substrat β-glicerofosfatul de sodiu în diverse soluţii tampon. S-a lucrat în acid citric-citrat trisodic 0,1 M şi acid succinic-hidroxid de sodiu 0,2 M pentru domeniul de pH cuprins între 3,5 şi 7; acid boric 0,2 M-borax 0,05 M pentru pH 7,5—9,5 şi carbonat-bicarbonat 0,2 M sau borax 0,05 M-hidroxid de sodiu 0,2 M pentru pH = 10. De remarcat că, pentru precipitarea proteinelor din extractele formaţiunilor seminţei în repaus sau după germinaţie, este necesar să se ajungă la o concentraţie de acid tricloracetic de 10% în mediul de reacţie; numai în cazul extractului din frunză se poate lucra cu concentraţia dată de autori (3%).

Acţiunea ionilor (cationi şi anioni) asupra activităţii fosfatazei acide s-a testat introducînd în mediul de reacţie oxalat de potasiu $2{,}7 \cdot 10^{-3}$ M, clorură manganoasă $6{,}3 \cdot 10^{-3}$ M, clorură de magneziu $6{,}1 \cdot 10^{-3}$ M, acetat de plumb $1{,}5 \cdot 10^{-3}$ M şi sulfat de zinc, sulfat de cupru sau molibdat de amoniu $1{,}2 \cdot 10^{-2}$ M, acţiunea enzimei desfăşurîndu-se în diferite medii tampon: acid citric-citrat trisodic 0,1 M, pH = 5,2 — — 6,7; acid succinic-hidroxid de sodiu 0,2 M pH = 5,2 — 6,2.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

pH-ul optim al activităţii fosfatazice. Din literatură reiese că pH-ul optim al fosfatazei acide din plante este cuprins între 4,5 şi 6,5. Fosfataza din sferozomii plantulelor de porumb [5] prezintă două maxime de activitate, la două valori de pH apropiate, 5,0 şi 6,5.

Întrucît cercetarea noastră cuprinde organe şi etape diferite ale dezvoltării porumbului, a fost necesară stabilirea pH-ului optim la care putem decela o acţiune fosfatazică, folosind ca substrat β-glicerofosfatul de sodiu. Pentru aceasta am dozat activitatea fosfatazei între pH 3,5 şi 10. Am constatat că fosfataza nespecifică din formaţiunile de porumb în repaus şi după germinaţie, precum şi cea din frunze este activă numai în zona acidă de pH. În tabela 1 am redat pH-urile sau zonele de pH stabilite ca optime pentru formaţiunile şi organele cercetate, în sistemele tampon: acid citric-citrat trisodic 0,1 M şi acid succinic-hidroxid de sodiu 0,2 M. În cazul în care am constatat o zonă optimă de pH mai largă, am redat şi valoarea la care am lucrat.

Se constată că pH-urile optime nu sînt identice în cele două sisteme tampon, fapt care indică o interacţiune între enzimă şi ionii tampoanelor utilizate. Fosfataza acidă din formaţiunile seminţei în repaus prezintă

Tabela 1

Zonele de pH stabilite ca optime pentru activitatea fosfatazei acide nespecifice din porumb*

Formațiunea sau organul		Sistemul tampon	
		acid citric-citrat trisodic	acid succinic-NaOH
Sămînță în repaus	ax embrionar	5,2	6,05 (4,7—6,1)
	scutel	5,5 (5,40—6,60)	5,5 (5,0—6,05)
	endosperm	6,2	5,6
Sămînță germinată	ax embrionar	5,4	6,20 (4,70—6,60)
	scutel	5,20	6,20
	endosperm	5,20	5,50 (4,40 —6,0)
Frunză		6,70	5,20

* Citirile pH-ului s-au făcut cu pH-metru Radiometer 22 Copenhaga.

pH-uri optime diferite. După germinația seminței, valoarea pH-ului optim rămîne practic aceeași, cu o singură excepție, în cazul enzimei din endosperm în prezența tamponului acid citric-citrat, cînd pH-ul optim scade cu o unitate. Fosfataza acidă a frunzei are în sistemul tampon acid citric-citrat un pH optim aproape de neutralitate, pH = 6,7. Aceasta este, de altfel, cea mai ridicată valoare de pH optim a fosfatazei din formațiunile și organele de porumb cercetate, iar în sistemul tampon acid succinic-hidroxid de sodiu, pH = 5,2, valoarea cea mai scăzută pentru acest tampon. Faptul că activitatea fosfatazică optimă are loc la pH-uri diferite arată că enzima nu este identică, avînd particularitățile ei în funcție de sursa din care provine.

Activitatea fosfatazică a extractelor analizate în cele două sisteme tampon este de obicei cu mult mai mare în sistemul tampon acid succinic-hidroxid de sodiu decît în sistemul tampon acid citric-citrat. Singura excepție o constituie fosfataza din endospermul semințelor de porumb germinate, la care activitatea în sistemul acid succinic-hidroxid de sodiu este de același ordin de mărime ca pentru cea din endospermul semințelor în repaus. În sistemul tampon acid citric-citrat, ea este însă de aproximativ 4 ori mai mare (tabela 2). Această comportare este însoțită, după cum am

Tabela 2

Valoarea activității fosfatazei acide (în γ —P/ml) în două sisteme tampon

Formațiunea analizată		γ-P eliberați la pH-ul optim		Succinic/ citric
		acid citric-citrat	acid succinic-NaOH	
Sămînță în repaus	ax embrionar	16	87	5
	scutel	21	115	5
	endosperm	21	68	3
Sămînță germinată	ax embrionar	86	180	2
	scutel	82	200	2,4
	endosperm	86	53	0,6
Frunză		90	166	1,8

arătat, de schimbarea pH-ului optim al enzimei, de la 6,2, cît era la sămînță, la 5,2, după germinare.

Constatarea noastră că sistemul tampon acid succinic-hidroxid de sodiu este favorabil activității fosfatazei acide din porumb, pe cînd sistemul tampon acid citric-citrat inhibă puternic activitatea enzimei (de 1,8—5 ori), excepție făcînd fosfataza acidă din endospermul seminței germinate, evidențiază rolul pe care acești ioni îl pot avea în metabolismul plantei în etapa respectivă. Este interesant cum un ion — ionul de citrat —, care în majoritatea cazurilor este inhibitor, poate deveni activator într-o anumită etapă de dezvoltare a unei formațiuni.

Acțiunea diverșilor ioni asupra activității fosfatazei acide. În tabela 3 redăm acțiunea unor ioni asupra activității fosfatazei acide din formațiunile seminței în repaus. După cum am arătat, activitatea fosfatazei acide din porumb este diferită, în funcție de sistemul tampon folosit. Din tabela 3 se observă că fosfataza acidă a formațiunilor seminței în repaus se comportă asemănător față de ionii folosiți, deci este o enzimă unitară ca răspuns la prezența ionilor.

Enzima din formațiunile seminței germinate (tabela 4) se comportă unitar pentru toate formațiunile, dar este diferită față de cea din sămînța în repaus sau din frunză (tabela 5). Deci, cu ajutorul ionilor am sesizat diferențe în comportarea fosfatazei acide nespecifice, în funcție de perioada de vegetație.

Tot din tabelele 3—5 reiese că acțiunea ionilor asupra fosfatazei acide diferă în funcție de sistemul tampon utilizat. Astfel, pe cînd în sistemul tampon acid citric-citrat ionii de Mg^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+} și Cu^{2+} activează fosfataza formațiunilor seminței în repaus, pentru enzima seminței germinate și pentru cea din frunză rămîn ca activatori numai ionii de Mn^{2+}, Mg^{2+} și Cu^{2+}. În sistemul tampon acid succinic-hidroxid de sodiu nu se observă nici o activare a enzimei formațiunilor seminței în repaus. Enzima seminței germinate este activată însă slab de ionii de $C_2O_4^{2-}$ și Mg^{2-}. Acești doi ioni activează însă net fosfataza acidă din frunze.

Și fenomenul de inhibare în prezența diverșilor ioni este diferit în cele două sisteme tampon. Astfel, în sistemul tampon acid citric-citrat, fosfataza acidă din formațiunile seminței în repaus este inhibată de ionii de $C_2O^2_4{}^-$ și $MoO_4{}^{2-}$. Enzima seminței germinate și cea din frunză este inhibată, în plus, și de cei de Pb^{2+} și Zn^{2+}. În sistemul tampon acid succinic-hidroxid de sodiu, toți ionii folosiți de noi inhibă fosfataza acidă din formațiunile seminței în repaus, dar în proporții diferite. Inhibarea cea mai puternică o exercită ionii de MoO_4^{2-}. Fosfataza formațiunilor seminței germinate este inhibată total de Zn^{2+}, Cu^{2+} și MoO_4^{2-}; Pb^{2+} o inhibă numai în proporție de 42—50%.

Fosfataza acidă din frunze are aproximativ aceeași comportare ca și enzima din semințele germinate, cu excepția că în prezența Zn^{2+} și chiar a Cu^{2+} ea este inhibată puternic, dar nu total.

Dintre ionii indiferenți, remarcăm ionii de Pb^{2+} în sistemul tampon acid succinic-hidroxid de sodiu pentru formațiunile seminței în repaus și ionii de Mn^{2+} pentru enzima din formațiunile seminței germinate și din frunză.

Deși comportarea enzimei față de diverșii ioni testați diferă numai în funcție de perioada de vegetație, într-o altă lucrare [6] am arătat că

Tabela 3

Acțiunea diverșilor ioni asupra activității fosfatazei acide din formațiunile seminței de porumb în repaus *

Sistemul tampon	Ax embrionar				Scutel				Endosperm			
	acid citric-citrat pH=5,2		acid succinic — NaOH pH = 6,05		acid citric-citrat pH=5,5		acid succinic — NaOH pH = 5,5		acid citric-citrat pH=6,2		acid succinic — NaOH pH = 5,6	
Raportul de extracție	1 g/5 ml				1 g/4 ml				1 g/2 ml			
Cantități de extract folosite (ml)	3		4		4		4		4		4	
ml folosiți pentru dozarea fosforului eliberat	10		10		10		8		10		10	
	γ_p	%	γ_p	%	γ_p	%	γ_p	%	γ_p	%	γ_p	%
Proba	16	100	116	100	21	100	98	100	21	100	68	100
$K_2C_2O_4$	5	32	100	86	7	33	86	87	12	57	60	88
$MnCl_2$	19	120	88	76	26	123	76	78	39	185	51	75
$MgCl_2$	19	120	92	79	18	118	84	85	19	120	57	83
$ZnSO_4$	22,5	141	32	27	29	142	39	39	49	228	28	39
$Pb(CH_3COO)_2$	16	98	50	43	21	100	64	58	20	95	37	53
$CuSO_4$	22,5	141	50	43	28	138	62	59	28	133	37	53
$(NH_4)_2MoO_4$	8	50	28	23	11	51	0	0	5	23	0	0

* In toate cazurile (tabelele 3, 4 și 5) reacția s-a desfășurat cu 1 ml substrat (β – glicerofosfat de sodiu 1,5%) și 5 ml tampon, timp de 30 min la 30°C. Oprirea reacției s-a făcut cu 5 ml acid tricloracetic. După centrifugare și adăugarea reactivilor de culoare s-a adus la un volum total de 25 ml.

Tabela 4

Acțiunea diverșilor ioni asupra activității fosfatazei acide din formațiunile seminței de porumb germinate

Sistemul tampon	Ax embrionar				Scutel				Endosperm			
	acid citric-citrat pH=5,4		acid succinic — NaOH pH = 6,2		acid citric-citrat pH=5,2		acid succinic — NaOH pH = 6,2		acid citric-citrat pH=5,2		acid succinic — NaOH pH = 5,5	
Raportul de extracție	1 g/2 ml				1 g/8 ml				1 g/1,5 ml			
Cantități de extract folosite (ml)	1		1		1		1		2		2	
ml folosiți pentru dozarea fosforului eliberat	8		8		8		8		8		8	
	γ_P	%	γ_P	%	γ_P	%	γ_P	%	γ_P	%	γ_P	%
Proba	86	100	180	100	82	100	200	100	86	100	53	100
$K_2C_2O_4$	75	87	196	108	73	88	214	107	73	84	60	112
$MnCl_2$	105	122	180	100	99	125	180	90	107	130	48	90
$MgCl_2$	101	116	160	111	94	114	210	105	100	116	57	107
$ZnSO_4$	41	47	0	0	36	46	0	0	39	45	2	3
$Pb(CH_3COO)_2$	75	87	76	42	77	94	95	47	71	82	25	47
$CuSO_4$	116	134	0	0	106	160	0	0	127	140	0	0
$(NH_4)_2MoO_4$	15	17	0	0	16	19	0	0	5	6	0	0

Tabela 5

Acțiunea diverșilor ioni asupra activității fosfatazei acide din frunzele de porumb

Sistemul tampon	Acid citric-citrat pH=6,7		Acid succinic-NaOH pH = 5,2	
Raportul de extracție	5 g/l ml			
Cantități de extract folosite (ml)	1		0,5	
ml folosiți pentru dozarea fosforului eliberat	8		8	
	γ_p	%	γ_p	%
Proba	90	100	83	100
$K_2C_2O_4$	80	88	107	128
$MnCl_2$	107	118	76	91
$MgCl_2$	97	107	95	115
$ZnSO_4$	73	81	14	16
$Pb(CH_3COO)_2$	38	42	38	45
$CuSO_4$	116	134	6	7
$(NH_4)_2MoO_4$	6	6	0	0

din punctul de vedere al mobilității electroforetice există o variabilitate a formelor moleculare sub care ea se găsește în formațiunile seminței în repaus sau după germinație.

Examinarea acestor date ne duce la două ipoteze : fie că fosfataza acidă nespecifică din surse diferite posedă particularități în ceea ce privește formele moleculare sub care ea se găsește, și acestea se pot evidenția cînd reacția enzimatică se produce în prezența diferiților ioni, fie că ea este de fapt suma unor fosfataze cu o specificitate mai largă, care se găsesc în proporții diferite în funcție de sursa din care provin și care sînt inhibate sau activate diferit de aceiași ioni.

CONCLUZII

1. Fosfataza acidă nespecifică din porumb prezintă particularități în comportarea ei față de β-glicerofosfat ca substrat, în funcție de formațiunea sau organul din care face parte și de faza de vegetație.

2. Se constată pH-uri optime diferite, cuprinse între 5,2 și 6,7, care pot caracteriza formațiunea și etapa de dezvoltare a porumbului.

3. Se remarcă o comportare diferită asupra substratului în cele două sisteme tampon folosite : acid citric-citrat și acid succinic-hidroxid de sodiu ; în sistemul tampon acid succinic-hidroxid de sodiu se observă

o creştere a activităţii fosfatazice de 1,8—5 ori faţă de cea din sistemul tampon acid citric-citrat, cu o singură excepţie : cazul enzimei din endosperm după germinaţia seminţei.

4. Ionii adăugaţi mediului de reacţie au un efect similar, unitar asupra enzimei din formaţiunile aceleiaşi etape de dezvoltare (formaţiunile seminţei de porumb în repaus, respectiv după germinaţie), dar diferit după perioada de vegetaţie (sămînţă în repaus, sămînţă germinată, frunză).

Prezentată la redacţie la 31 decembrie 1968

Institutul de biochimie al
Academiei Republicii Socialiste România

BIBLIOGRAFIE

1. F. C. Mayer, R. E. Campbell, A. K. Smith, L. L. McKinney, Arch. Biochem. Biophys., **94**, 301 (1961).
2. M. Z. Newmark, B. S. Wenger, Arch. Biochem. Biophys., **89**, 110 (1960).
3. J. G. Shaw, Arch. Biochem. Biophys., **117**, 1 (1966).
4. R. Portocală, L. Popa, *Acizii ribonucleici celulari şi virali*, Edit. Academiei, Bucureşti, 1966, p. 318.
5. P. Matile, J. P. Balz, E. Semadeni, M. Jost, Z. Naturforsch., **20 b**, 7, 693 (1965).
6. V. Alexandrescu, D. Popov, Rev. roum. Biochim., **6**, 2, (1969).

THE INFLUENCE OF SOME IONS ON THE ACTIVITY OF MAIZE ACID PHOSPHATASE

SUMMARY

The activity of the non-specific acid phosphatase of non germinated and germinated maize seed formations, as well as that from the leaf was tested in two buffer systems : succinic acid-NaOH and citric acid-citrate. This activity has different optimum pH values ranging from 5.2 to 6.7 which could characterize the formation itself as well as the development period.

In the presence of β-glycerophosphate as substrate, it was observed that the activity is 1.8 to 5 times greater than in the citric acid-citrate buffer, except the case of the germinated endosperm.

Ions added to the reaction mixture have a similar effect on the enzyme from the formations of the same development period (the formations of non-germinated and germinated seed) and a different one according to the vegetative period (seed, germination, leaf).

ST. CERC. BIOCHIM., 12, 2, 129–133 (1969)

SE DIFERENȚIAZĂ IZOENZIMELE ȘI PRIN COEFICIENTUL VAN'T HOFF?

I. BRAD, ZOIȚA MARCU, ELENA MOLDOVEANU și ȘT. NICULESCU

Rezumat. Sînt prezentate rezultatele referitoare la variația activității catalazei, la soiuri de orz cu rezistență diferită la ger, apoi rezultate referitoare la variația coeficientului van't Hoff la aceleași plante, precum și rezultate referitoare la existența izocatalazelor la plăntuțe de secară, grîu și orz. Se formulează ipoteza că izocatalazele se diferențiază prin coeficientul van't Hoff și că o diferențiere similară este verosimilă și pentru alte izoenzime.

Este bine cunoscut faptul că, în ultima vreme, cercetările de enzimologie s-au concentrat asupra studiului izoenzimelor. S-a constatat că numeroase enzime sînt constituite din fracțiuni care au putut fi puse în evidență prin electroforeză [1]. Această separare diferențiată în cîmpul electric a scos în evidență unele caracteristici legate de structură și de sarcina electrică. Alte cercetări au arătat că izoenzimele se diferențiază și din punctul de vedere al pH-ului optim, al temperaturii optime, al constantei Michaelis, al răspunsului față de stimulatori și inhibitori și al concentrației substratului [2][1] sau au dus numai la formularea unor ipoteze. Nu am găsit lucrări care să demonstreze sau numai să formuleze ipoteza referitoare la diferențierea izoenzimelor după energia de activare, respectiv după coeficientul de temperatură van't Hoff.

În această lucrare am formulat ipoteza că izoenzimele catalazice și, probabil, și celelalte izoenzime se deosebesc și prin coeficientul de temperatură van't Hoff. În formularea acestei ipoteze ne-am întemeiat pe unele rezultate anterioare ale noastre și pe unele cercetări recente referitoare la existența mai multor fracțiuni catalazice. Prin analogie cu alte cercetări care atestă diferențierea izoenzimelor [1], am considerat ca foarte probabilă și diferențierea lor după coeficientul van't Hoff. Ca temei care să justifice formularea acestei ipoteze, am considerat că este necesar și suficient să se dovedească prezența izocatalazelor, diferențieri ale coeficienților van't Hoff, diferențieri ale activității catalazei, pentru condiții similare de lucru, la organe sau plante diferite.

Ultimele două premise ne-au fost furnizate de cercetările întreprinse în legătură cu rezistența la ger la diferite soiuri de orz, bine diferențiate ca răspuns față de temperatură. Prima premisă a fost furnizată de cercetările referitoare la prezența izocatalazelor la diferite specii și soiuri

[1] Lucrare în curs de publicare.

de cereale de toamnă (secară, grîu, orz), foarte bine diferenţiate ca rezistenţă la ger. Aceste ultime cercetări au fost întreprinse tocmai pentru a se vedea dacă se pot descoperi la nivelul izoenzimelor diferenţieri sistematice ce se pot corela cu rezistenţa la ger.

MATERIAL ŞI METODĂ

În experienţele referitoare la variaţia activităţii catalazei şi a coeficientului de temperatură s-au folosit patru soiuri de orz : Odessa Solovei, foarte rezistent la ger, Cenad 396, cu rezistenţă intermediară, Cenad 345 şi Mahndorfer, cu rezistenţă mai mică. Amănuntele referitoare la material şi metodă, tehnici şi prelucrări sînt prezentate în lucrările publicate anterior [3], [4].

În experienţele referitoare la prezenţa izocatalazelor am lucrat cu plantule de : secară Petkus, foarte rezistentă la ger, grîu Triumph, rezistent la ger, grîu San Pastore, puţin rezistent la ger, şi orz Cenad 396, cu o rezistenţă mai mică decît grîul Triumph. Plăntuţele au fost recoltate cînd tulpiniţa a avut 3—5 cm. Modul de prelucrare a materialului, modul de realizare a electroforegramelor şi evidenţierea izoenzimelor au fost prezentate într-o lucrare anterioară [5]. Izocatalazele au fost puse în evidenţă prin apariţia bulelor de oxigen în masa gelului. Numărul, densitatea şi dimensiunile lor depind de activitatea catalazei (fig. 1, 2 şi 3).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Din analiza rezultatelor prezentate în tabela 1 se constată variaţii ale activităţii catalazei în funcţie de rezistenţa la ger şi de momentele de recoltare o dată cu înaintarea în iarnă. Ca fenomen general, se constată scăderea activităţii catalazei (22.I.1957), observîndu-se însă şi creşterea activităţii catalazei după intrarea în iarnă. Acelaşi fenomen de scădere şi de creştere a activităţii catalazei după scăderea temperaturii a fost observat şi la grîul de toamnă [3].

Determinările paralele făcute pentru calcularea coeficientului de temperatură van't Hoff au dus la constatarea că au loc variaţii mult mai puternice ale acestuia, cu scăderi foarte puternice la toate soiurile studiate, şi în special la soiul cel mai rezistent — Odessa Solovei (22.I.1957). În unele cazuri, acest coeficient se micşorează pînă la 40% din valoarea iniţială, iar în primăvară el creşte apoi cu aproximativ 250% faţă de valorile cele mai scăzute din timpul iernii (tabela 2).

Este demn de observat, în acelaşi timp, că creşterile sau scăderile activităţii catalazei nu sînt însoţite de creşteri sau scăderi ale coeficientului van't Hoff. Sînt numeroase situaţii în care variaţiile sînt inverse ca sens. Totodată este de remarcat faptul că variaţiile coeficientului de temperatură sînt cu mult mai mari decît cele ale activităţii catalazice globale.

Aceste date ne conduc la concluzia că are loc concomitent o modificare a cantităţii şi calităţii catalazei, care nu poate să fie interpretată decît

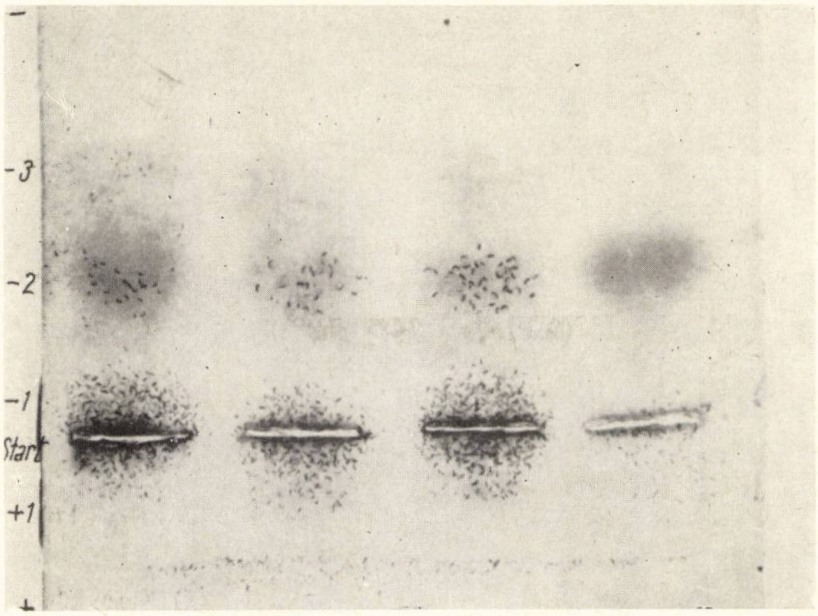


Fig. 1. — Izoenzime catalazice la tulpiniță.
De la stînga la dreapta: secară Petkus, grîu Triumph, grîu San Pastore, orz Cenad 396.

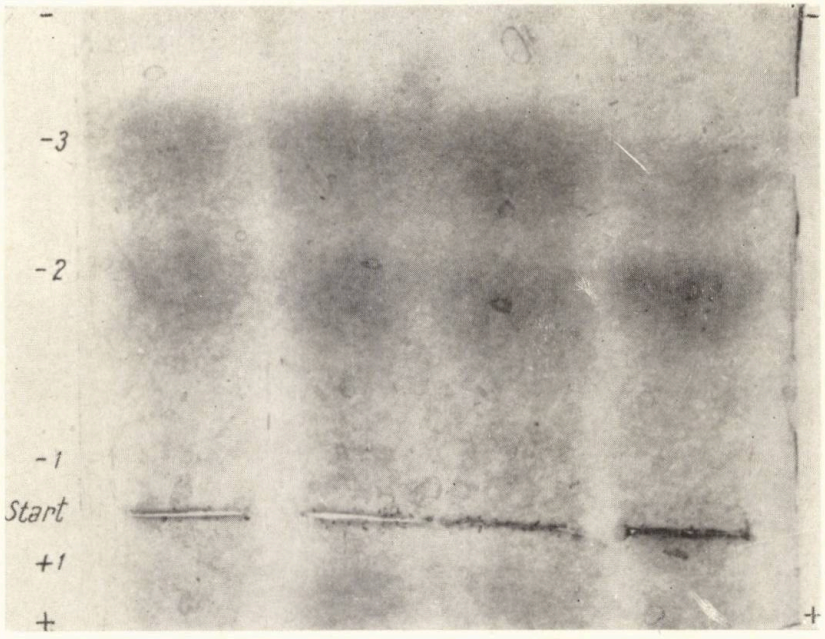


Fig. 2. — Izoenzime catalazice la endosperm.
De la stînga la dreapta: secară Petkus, grîu Triumph, grîu San Pastore, orz Cenad 396.

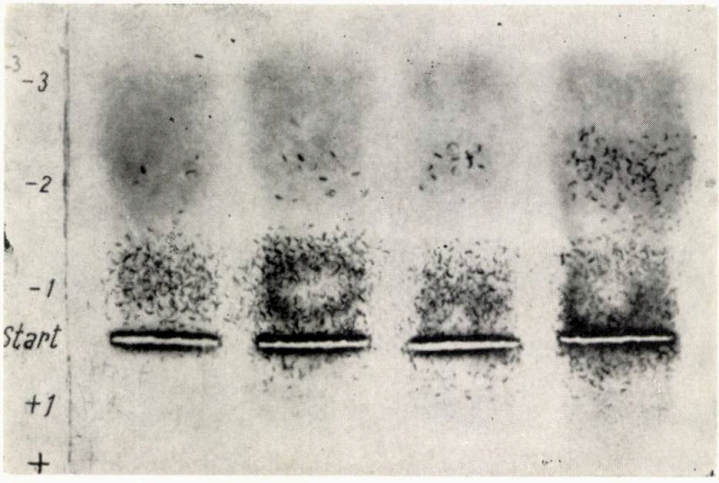


Fig. 3. — Izoenzime catalazice la rădăciniță.
De la stînga la dreapta: secară Petkus, grîu Triumph, grîu San Pastore, orz Cenad 396.

numai ca modificare a structurii apoenzimei, a moleculei proteice a catalazei. În acest caz s-ar admite că pot exista mai multe izocatalaze. Fenomenul poate fi interpretat dacă se acceptă apariţia unei alte fracţiuni izocatalazice, cu un coeficient van't Hoff mai scăzut, sau dacă se acceptă ideea modificării raportului cantitativ dintre fracţiunile preexistente. Dacă această ipoteză este justă, atunci înseamnă că, în mod obligatoriu, trebuie să se evidenţieze mai multe fracţiuni izocatalazice, care trebuie să se găsească în proporţii diferite, la organe diferite, la specii şi soiuri diferite. Trebuie ţinut seama şi de faptul că există diferenţieri din punctul de vedere al rezistenţei la temperaturi scăzute, în funcţie de gradul de călire a plantei, de organ, specie şi condiţii pedoclimatice.

Cercetările întreprinse de noi pe tulpiniţă (fig. 1), endosperm (fig. 2) şi rădăciniţă (fig. 3) la secară, la cele două soiuri de grîu şi la orz, organe şi plante bine diferenţiate ca răspuns faţă de temperaturile scăzute, au scos în evidenţă existenţa izocatalazelor, precum şi diferenţieri în ceea ce priveşte numărul şi proporţia acestora.

Atragem atenţia că pentru uşurarea expunerii am notat cu semnul — toate fracţiunile situate către catod în raport cu startul, —1 fiind notaţia fracţiunii celei mai apropiate de start. De asemenea am notat cu + fracţiunile situate către anod în raport cu startul, +1 fiind notaţia fracţiunii celei mai apropiate de start. Nu s-a ţinut seama de fenomenul de electroendosmoză la stabilirea notaţiei +1 sau —1.

Analizînd figura 1, se observă că la tulpiniţă numărul fracţiunilor catalazice descreşte de la stînga la dreapta. În prima electroforegramă sînt trei fracţiuni deplasate către catod în raport cu startul, în a doua şi a treia cîte două, iar în a patra nici una. La endosperm (fig. 2) se observă o fracţiune catalazică slabă în zona startului la toate plantele şi o a doua fracţiune catodică, de asemenea slabă, la orz. În cazul rădăciniţei (fig. 3) se observă două fracţiuni deplasate către catod şi o intensificare a activităţii catalazice de la stînga la dreapta, în special a fracţiunii mai puternic deplasate către catod (—2). Aceeaşi intensificare, mai puţin evidentă, se observă şi la fracţiunea —1. Fracţiunea +1 se intensifică de asemenea apreciabil. La tulpiniţă (fig. 1) se observă variaţii apreciabile între plante la fracţiunea deplasată către anod în raport cu startul, precum şi la fracţiunile deplasate către catod (—1, —2 şi —3).

Constatările prezentate în figurile 1, 2 şi 3 duc în mod incontestabil la concluzia variaţiei raportului izocatalazelor la organe diferite ale aceleiaşi plante, ca şi la acelaşi organ al unor plante diferite, adică tocmai ceea ce trebuia demonstrat.

În dezvoltarea ulterioară a plantelor, în condiţii variabile de temperatură şi alţi factori de mediu, aceste fracţiuni s-ar putea modifica fie ca număr şi ca proporţii, fie numai într-un singur sens şi vor determina modificările cantitative şi calitative ilustrate în tabelele 1 şi 2.

Deşi susţinerea diferenţierii izoenzimelor prin coeficientul van't Hoff se face printr-un procedeu aparent indirect, considerăm că argu-

mentele sînt suficient de convingătoare pentru a considera că ipoteza noastră este verosimilă, dacă nu chiar parţial demonstrată. Cercetările ulterioare vor fi îndreptate în sensul acumulării de noi argumente, în

Tabela 1

Variaţia activităţii catalazei în ml O_2 degajat în 3 min, la 17°C, la cîteva soiuri de orz cu rezistenţă diferită la ger

Soiul	8.XI.1956	28.XI. 1956	7.I.1957	22.I.1957	18.II.1957	27.III. 1957	11.V. 1957
Odessa-Solovei	60,20	51,09	57,80	55,60	65,30	80,00	83,20
Mahndorfer	59,10	71,60	65,60	50,00	64,30	88,00	61,20
Cenad 396	69,20	71,50	72,00	57,50	68,20	92,20	74,60
Cenad 345	59,40	47,30	68,40	55,40	66,70	87,00	62,20

Tabela 2

Variaţia coeficientului Q 13 (17 – 4°C) la cîteva soiuri de orz cu rezistenţă diferită la ger

Soiul	8.XI.1956	28.XI. 1956	7.I.1957	22.I.1957	18.II.1957	27.III. 1957	11.V. 1957
Odessa-Solovei	2,62	2,09	1,17	1,96	2,11	4,73	2,14
Mahndorfer	2,38	2,55	1,67	1,37	2,40	3,65	2,35
Cenad 396	2,32	2,43	1,47	1,38	1,44	3,14	2,53
Cenad 345	2,15	1,79	1,65	1,65	1,90	4,33	2,70

sensul separării izoenzimelor catalazice şi al determinării coeficientului van't Hoff pentru fiecare din ele.

CONCLUZII

Rezultatele referitoare la variaţia activităţii catalazei la soiuri de orz diferite ca rezistenţă la ger în timpul iernii, coroborate cu rezultatele referitoare la variaţia coeficientului van't Hoff, precum şi cu constatarea existenţei fracţiunilor izocatalazice la specii şi soiuri diferite ca rezistenţă la ger, conduc la ipoteza că izocatalazele şi, probabil, şi alte izoenzime se diferenţiază şi prin coeficientul van't Hoff.

Prezentată la redacţie la 12 septembrie 1968

I.C.C.P.T. — Fundulea,
Secţia de fiziologie şi biochimie,
Laboratorul de biochimie

BIBLIOGRAFIE

1. J. H. Wilkinson, *Isoenzymes*, Ed. E. and F. N. Spon, Londra, 1965.
2. P. Brown, J. L. Wray, Biochem. J., **108**, *3*, 437 (1968).
3. I. Brad, St. cerc. biochim., **8**, *3*, 293 (1965).
4. Gh. Valuţă, I. Brad, Iulia Laszlo, St. cerc. biochim., **2**, *2*, 147 (1959).
5. I. Brad, N. Hurduc, Şt. Niculescu, Zoiţa Marcu, St. cerc. biochim., **11**, *2*, 117 (1968).

CAN THE VAN'T HOFF'S COEFFICIENT BE A CRITERION FOR DIFFERENTIATING ISOENZYMES?

SUMMARY

Results concerning the activity of catalase in several barley sorts with different degrees of frost resistance as well as the variation of Van't Hoff's coefficient of the same plants are presented. The existence of catalase isoenzymes in rye, wheat and barley seedlings was evidenced. The hypothesis is advanced that catalase isoenzymes may be differentiated by their Van't Hoff's coefficient and that a similar difference presumably exists in other isoenzymes.

— c. 3239

ST. CERC BIOCHIM., 12, 2, 135 – 151 (1969)

FENOMENE CUANTICE ÎN BIOLOGIE

UN NOU PUNCT DE VEDERE TEORETIC ŞI EXPERIMENTAL

SORIN COMOROŞAN

Rezumat. În lucrarea de faţă este prezentată o tratare teoretică de tip cuantic a mecanismului interacţiunilor specifice în sistemele biologice. O observabilă $\mathcal{J}$ (observabila substratului) se consideră că poartă atributul fizic care corespunde „afinităţii" dintre substrat şi receptorul său corespunzător.

Un „aparat de măsură" în sistemul microfizic, identificat ca enzimă (sau mai general receptor celular), va specifica valoarea proprie a acestei observabile $\mathcal{J}$ în oricare stare cuantică particulară Ψ_i.

Este dezvoltată o analiză teoretică a variatelor tipuri de structură matematică pe care observabila $\mathcal{J}$ le poate lua şi a efectelor posibile care rezultă din fiecare din aceste tipuri de structură în legătură cu reacţiile enzimologice.

Este dată o dovadă experimentală directă a imaginii teoretice prezentate.

Se prezintă o metodă de perturbaţie a substratului care utilizează iradierea diferitelor substrate chimice cu raze X în doze foarte mici, care să nu altereze structura lor chimică. Totuşi, aceste substrate „perturbate" dovedesc schimbări cinetice semnificative în concordanţă cu prezicerile teoriei.

O serie de substanţe chimice (uree, acid uric. xantină, hipoxantină) au fost cercetate în acest sens. O „stimulare" a reacţiilor enzimatice corespunzătoare a fost obţinută cu o „perturbare blîndă" în jur de 1 r. De asemenea, este atins un „prag de perturbaţie", cînd efectul devine invers.

Este arătată o corelaţie între energia de rezonanţă pe electron π în seria acid uric-xantină-hipoxantină şi doza „pragului de perturbaţie" pentru efectele de stimulare şi inhibare în aceeaşi serie.

Studiul proprietăţilor unui sistem biologic, din punct de vedere cuantic, poate fi încercat pe două căi. Prima reprezintă utilizarea tehnicilor standard ale mecanicii cuantice, adică rezolvarea ecuaţiei lui Schrödinger pentru sistemul studiat. La nivel molecular, soluţia acestei probleme implică superpoziţia unui foarte mare număr de funcţii de undă. În afara dificultăţilor strict matematice, aproximaţiile obţinute prin această tehnică sînt foarte grosiere şi, evident, greu de aplicat la descrierea proprietăţilor sistemelor biologice.

În acest context este interesant de remarcat că Wigner [25] găseşte că mecanica cuantică duce la probabilitatea practic zero pentru existenţa stărilor autoreproductibile.

A doua cale o reprezintă utilizarea metodei *relaționale*, adică studiul proprietăților relaționale ale observabilelor mecanicii cuantice.

Deși acest studiu este vechi în mecanica cuantică [24] și posedă o serioasă reprezentare modernă [22], introducerea lui în biologie este de dată recentă.

Rashevsky [16] remarcă diferența dintre „*constantele* universale" ale fizicii și ceea ce el numește „*relațiile* constante" ce caracterizează biologia.

Introducerea punctului de vedere relaționist al mecanicii cuantice în analiza sistemelor biologice a dus la rezultate neașteptate [15] [17]. În particular, Rosen [18]—[20] a perezentat un nou tip de analiză teoretică a informației genetice. El presupune că informația genetică primară este inclusă într-o familie de stări ale unui sistem microfizic particular și explicitată prin valoarea luată de o observabilă specifică în fiecare din aceste stări. Valorile proprii ale acestei observabile sînt determinate de un „aparat microfizic de observație" (în sens cuantic), în conformitate cu legile generale ale măsurii.

Apare astfel posibilitatea teoretică de a studia tipurile de structuri matematice pe care observabilele sistemului biologic investigat le pot lua și, respectiv, diferitele consecințe biologice ce decurg din aceste structuri.

În cele ce urmează prezentăm o astfel de tratare teoretică privind interacțiunile specifice în sistemele biologice.

Teoria noastră a fost dezvoltată la început în contextul mecanismului de acțiune al enzimelor [3], dar ea poate fi ușor extinsă la orice fel de interacțiune de tip substrat-receptor.

BAZELE TEORETICE

(A_1) Tratarea teoretică pornește de la două axiome naturale:
Orice substanță chimică S, capabilă de a interacționa specific cu un „receptor", este considerată un *sistem microfizic*, adică un ansamblu de observabile ce caracterizează respectiva specie chimică.
În contextul nostru, *observabila* reprezintă o anumită proprietate a sistemului și este definită ca o funcție cu valori reale (adică o corespondență din spațiul stărilor sistemului în numerele reale).

(A_2) Într-o interacțiune biochimică „specifică" (de tip enzimă — substrat sau, mai general, substrat — receptor), macromolecula responsabilă de specificitate este considerată ca *sistem de măsură*.
În mecanica cuantică se înțelege prin aceasta un sistem capabil să interacționeze cu o varietate de alte sisteme.
Rezultatul unei astfel de interacțiuni poate să fie:
— un număr definit, în care caz acesta reprezintă o caracteristică a stării sistemului studiat la timpul t al interacțiunii;
— un număr nedefinit, în care caz interacțiunea nu a avut loc.

Dacă axioma (A_1) este naturală, în schimb axioma (A_2) ridică următoarea problemă de fond: există posibilitatea teoretică ca o reacție bio-

chimică să funcţioneze ca „aparat de măsură"? Demonstrarea completă a acestei probleme a fost dată de Rosen [19].

Să considerăm o reacţie generală de forma:

$$A_1 + A_2 + \ldots A_n \longrightarrow \text{Produse.} \tag{1}$$

Să considerăm situaţia în care sînt prezente n-1 componente şi lipseşte compusul A_{i_0}. Este clar că în acest caz starea reprezentată prin $\sum_{i\neq i_0} {}_{i=1}^{n} A_i$ poate fi privită ca un „aparat de măsură" pentru detectarea stărilor A_{i_0}, dacă este îndeplinită condiţia:

$$\sum_{i\neq i_0} {}_{i=1}^{n} A_i + A_{i_0} \longrightarrow \text{Produse} + A_{i_0}. \tag{2}$$

Această condiţie implică necesitatea ca sistemul „măsurat" să joace rol de „catalizator" în reacţia respectivă. Apare astfel o discrepanţă faţă de cataliza enzimatică. Cum însă se poate vedea uşor, discrepanţa este doar aparentă. Într-adevăr, scriind reacţia dintre enzimă şi substrat împreună cu complexul intermediar (ES), orice reacţie enzimatică poate fi adusă la forma [2]. Se justifică astfel posibilitatea ca enzimele să funcţioneze ca „sisteme microfizice de măsură" şi, implicit, axioma noastră (A_2).

În acest context apare însă o a doua problemă, mai subtilă, legată de „reversibilitatea" sistemelor de măsură. După cum se ştie din mecanica cuantică, o *ireversibilitate fundamentală* este ataşată de funcţionarea tuturor sistemelor microfizice de măsură. Situaţia se prezintă astfel: cînd se studiază efectul măsurii asupra sistemului S, acesta nu poate fi considerat într-o *stare izolată*. De fapt, trebuie determinată interacţiunea lui S cu sistemul de măsură M; cu alte cuvinte, se studiază de fapt sistemul $S + M$, adică relaţia dintre starea lui S şi unele proprietăţi ale stării lui M.

Fie U un operator statistic, R un atribut fizic oarecare al sistemului şi $\mathcal{R}$ operatorul său corespunzător. Fie λ_1, λ_2 ... valorile proprii din spectrul punctual $\sigma_p(\mathcal{R})$ şi φ_1, φ_2 ... sistemul ortonormal complet corespunzător funcţiilor proprii. După ce procesul de măsură a avut loc în fracţiunea $(U_{\varphi_m}, \varphi_m)$ a ansamblului iniţial, valoarea lui R este λ_n ($n = 1, 2 \ldots$), deci această fracţiune reprezintă un ansamblu în care R are valoarea λ_n, adică R este starea φ_n, iar operatorul statistic corespunzător va fi $P[\varphi_n]$. Cînd aceste diferite fracţiuni componente sînt din nou amestecate, operatorul statistic al amestecului va fi

$$\sum_{n=1}^{\infty} (U_{\varphi_n, \varphi_n})\, P[\varphi_n], \tag{3}$$

deci procesul de măsură a introdus în sistem o perturbaţie dată de

$$U \longrightarrow U' = \sum_{n=1}^{\infty} (U_{\varphi_n, \varphi_n}) P[\varphi_n]. \tag{4}$$

În limbaj mai puţin formalizat, aceasta înseamnă că orice măsură executată asupra unui sistem într-o stare determinată este *ireversibilă* (cu excepţia cazurilor cînd atributul măsurat are o valoare unică). Mai mult, acest tip de măsură cuantică *măreşte întotdeauna entropia sistemului.*

În contextul nostru, aceasta înseamnă că molecula proteică a enzimei va suferi în decursul măsurătorilor repetate procese ireversibile, care o vor denatura și în cele din urmă o vor face nefuncțională. Fără a fi exprimat explicit, acesta este un fenomen uzual întîlnit în reacțiile biochimice și corespunde *turnover*-ului moleculei enzimatice. Într-un context diferit [2] am dat demonstrația teoretică a condițiilor necesare pentru restabilirea unei molecule de enzimă într-un sistem biologic abstract. În ceea ce privește efectele entropice în reacțiile enzimatice, un punct de vedere modern a fost prezentat de Hammes [9]. El a introdus ideea „entropiilor activatoare de compensare" și a arătat că entropia formării complexelor enzimă-substrat este adeseori *mai pozitivă* decît se prevede pe baza simplelor considerații electrostatice sau de hidratare. Măsurători ale volumelor de activare sugerează că structura enzimei este „desfăcută" (*loosened*) în timpul formării complexului ES și sprijină ideea compensării parametrilor de activare, ceea ce implică o continuă schimbare a conformației proteice în decursul reacției.

Aceste noi concepte entropice sprijină ideea exprimată de noi în (A_2) și fundamentează ideea considerării procesului biochimic de formare a complexului ES ca un proces de măsură cuantic.

Să analizăm în continuare structura matematică a observabilelor unui substrat biochimic S, conform axiomei (A_1).

Prima problemă care se pune este aceea a naturii observabilelor ce caracterizează, conform (A_1), sistemele noastre microfizice S_i ($1 \leqslant i \leqslant n$). Să notăm cu $\mathcal{S}$ setul observabilelor lui S, legate de „informația chimică a substratului". Se pune problema dacă observabilele din $\mathcal{S}$ comută sau nu.

Este clar că ipoteza necomutabilității nu poate fi considerată, ea ducînd implicit la imposibilitatea măsurării *simultane* a valorilor observabilelor lui $\mathcal{S}$ în oricare stare a lui S. În termeni biochimici, acest lucru ar însemna diferențe cinetice mari, într-o reacție enzimatică particulară, la două determinări succesive, ceea ce contrazice sistemele reale biochimice.

Pe de altă parte, ipoteza comutabilității observabilelor din setul $\mathcal{S}$ duce la posibilitatea teoretică de a considera fiecare din observabilele lui $\mathcal{S}$ ca o funcție de o singură observabilă, pe care o vom nota în cele ce urmează cu $\mathcal{J}$. Nu dăm demonstrația acestei afirmații. Ea se bazează pe teorema lui von Neumann (11) și referim pentru detalii la indicația respectivă.

Generalizînd afirmația de mai sus, putem considera orice sistem care conține observabila $\mathcal{J}$ ca fiind capabil de a poseda „informație de substrat". În terminologie biochimică, aceasta înseamnă că atributul fizic corespunzător observabilei noastre $\mathcal{J}$ este suficient pentru a caracteriza univoc comportarea cinetică a substratului S într-o reacție biochimică specifică. În terminologie cuantică se spune că observabila $\mathcal{J}$ reprezintă o *alegere completă*.

Este evident că acest raționament nu poate duce la o explicitare analitică a observabilei $\mathcal{J}$. Acest lucru nici nu este necesar, întrucît rezultatele noastre derivă din analiza proprietăților *relaționale* ale observabilelor. De altfel, în fizică se definesc curent operatori pe baza „proprietăților", fără explicitarea analitică a funcției respective (de exemplu spinul, operatorii de anihilare din fizica solidului etc.).

Să considerăm acum condițiile de mărginire a lui $\mathcal{J}$. Dacă $\mathcal{J}$ este mărginit, rezultă că spectrul său $\sigma(\mathcal{J})$ poate fi format sau dintr-o mulțime infinită, în care caz $\sigma(\mathcal{J})$ trebuie să conțină cel puțin un punct de acumulare, sau dintr-o mulțime finită, în care caz cel puțin una din valorile proprii ale lui $\mathcal{J}$ trebuie să aibă multiplicitate infinită. Pe de altă parte, dacă $\mathcal{J}$ este mărginit, atunci operatorul corespunzător nu poate fi definit peste tot în spațiul Hilbert asociat.

Apare astfel un prim rezultat al discuției teoretice de mai sus, adică existența unor stări ale substratelor biochimice în care $\mathcal{J}$ nu poate lua valori. Rezultă, ca o consecință teoretică, situația reală că o anumită substanță chimică nu poate funcționa în *orice condiție* ca substrat pentru o reacție enzimatică corespunzătoare. Să analizăm acum proprietățile matematice ale lui $\sigma(\mathcal{J})$ (pentru detalii, vezi Rosen [18]).

Situația în contextul nostru este următoarea : fiind dat un număr λ_i în spectrul punctual $\sigma_p(\mathcal{J})$ al observabilei $\mathcal{J}$ într-o stare particulară Ψ_i dintr-un sistem determinat S_i, există o probabilitate definită ca aparatul de măsură (AM) corespunzător să separe din ansamblul sistemelor S_1, S_2 ... conținînd observabila $\mathcal{J}$ numai stările Ψ_i ale lui S_i, în care observabila $\mathcal{J}$ ia valoarea λ_i. În spectrul continuu $\sigma_c(\mathcal{J})$, problema este următoarea : fiind dat un număr ξ_i în $\sigma_c(\mathcal{J})$ al observabilei $\mathcal{J}$ într-o stare particulară Ψ_i a unui sistem determinat S_i, există o probabilitate definită ca aparatul de măsură (AM) corespunzător să discearnă stările respective pînă la orice grad de exactitate prescris anterior.

Să considerăm situația

$$\sigma_p(\mathcal{J}) \neq \emptyset. \tag{5}$$

În contextul nostru, ea reprezintă un caz simplu : fiecărei stări Ψ a sistemului microfizic (adică a unui substrat biochimic bine determinat) îi va corespunde o valoare proprie λ, care va fi „raportată" de aparatul (AM) corespunzător. Ansamblul valorilor λ „observate" în contextul nostru va constitui „puterea de rezoluție" a lui (AM), adică a respectivei enzime sau a respectivului receptor celular.

Să considerăm

$$\sigma_c(\mathcal{J}) \neq \emptyset. \tag{6}$$

Această situație prezintă aspecte ceva mai subtile. În acest caz, spectrul lui $\mathcal{J}$ posedă puncte de acumulare. În vecinătatea unui astfel de punct, indiferent de „rezoluția" lui (AM), probabilitatea ca două valori λ_1 și λ_2 să nu fie discernate este mare. Această probabilitate crește monoton spre unitate, cînd raza respectivei vecinătăți tinde spre zero. Acest lucru este deosebit de interesant, deoarece, conform principiilor cuantice, în urma unei perturbații corespunzătoare, tranzițiile $\sigma_p \to \sigma_c$ sînt permise. Dar acest fapt va tinde să mărească probabilitatea erorilor legate de „puterea de rezoluție" limitată a lui (AM).

Implicațiile experimentale ale acestei situații sînt prezentate în cadrul rezultatelor.

Trecem acum la analiza interacțiunii dintre mediu și observabila noastră $\mathcal{J}$. Acest tip de studiu se face în mecanica cuantică cu ajutorul

teoriei generale a perturbației (vezi, de exemplu, De Witt [7]). Problema constă în a găsi soluția relației:

$$\mathcal{J}\Psi = (\mathcal{J}_0 + \nu)\Psi = \lambda\Psi, \tag{7}$$

unde $\mathcal{J}$, observabila „perturbată", diferă de observabila inițială $\mathcal{J}_0$ printr-o „corecție" ν.

Să considerăm un sistem cuantic *compus*, adică un ansamblu de molecule de specie S, conținînd observabila $\mathcal{J}$, fiecare în oricare din stările Ψ_i $(i = 1, 2 \ldots n)$, ceea ce din punct de vedere chimic este realizat într-o populație naturală de atomi, cu o distribuție definită de izotopi și manifestînd proprietăți chimice identice.

Din punct de vedere enzimatic, acest sistem reprezintă un ansamblu de stări Ψ_i $(i = 1, 2 \ldots n)$ ale căror valori proprii λ_i sînt egal „măsurate" de aparatul (AM) corespunzător.

Cum în contextul nostru „măsura" unei valori proprii într-o stare cuantică definită reprezintă tocmai formarea complexului (ES), urmează că fiecărui λ_i $(i = 1, 2 \ldots n)$ îi va corespunde o constantă k_i $(i = 1, 2 \ldots n)$ pentru viteza de formare a lui ES.

Atunci

$$V = K\,[ES],$$

unde

$$K = \sum_{i=1}^{n} k_i. \tag{8}$$

Să introducem o perturbație în acest sistem. Ca urmare a perturbației, o serie din stările sistemului vor fi modificate. Astfel, o stare Ψ va fi înlocuită cu starea Ψ', reprezentînd starea proprie a unei noi observabile perturbate $\mathcal{J}'$, care corespunde unei valori proprii λ', adică

$$\mathcal{J}'\Psi' = \lambda'\Psi'. \tag{9}$$

Din punct de vedere teoretic, apar următoarele posibilități:

a) λ' este așezat în spectru foarte aproape de λ (adică perturbația a fost foarte mică). Constanta de viteză k' nu influențează sensibil pe K și reacția enzimatică rămîne nemodificată.

b) λ' este „deplasat" în spectru aproape de o altă valoare proprie $\lambda_j \neq \lambda$.

În acest caz apar următoarele situații:

— λ_j corespunde unei constante k_j, ducînd la creșterea vitezei de formare a complexului (ES);

— λ_j corespunde unei constante k_j în cazul opus. Urmează că, în funcție de *numărul* și *natura* acestor tranziții $\Psi \to \Psi'$, valoarea lui K în (8) se modifică și, teoretic, se poate prezice o schimbare a cineticii enzimatice. În partea experimentală se dă o dovadă directă a acestei ipoteze.

c) λ' este „îndepărtat" din „spectrul de rezoluție" al lui (AM) (adică perturbația a fost foarte mare) și, în consecință, reacția enzimatică este oprită.

O situație particulară apare dacă σ (I) conține valori proprii *degenerate*. În acest caz, substratul S, cu observabila $\mathcal{J}$, poate fi considerat ca o populație naturală de n molecule, fiecare într-o stare particulară ψ_i ($i = 1, 2 \ldots n$), *toate* stările corespunzînd aceluiași λ (adică λ are multiplicitate n). Dacă într-un astfel de sistem se introduce o perturbație, stările variate corespunzînd unei valori proprii degenerate vor fi separate în general în stări distincte.

Acest efect de *splitting* poate avea consecințe importante pentru sistemele biologice. În cazul nostru se poate prezice o variație a cineticii de formare a complexului (ES), în funcție de noile valori ale valorii proprii „desfăcute".

Este evident că așa-numitul „efect izotopic", bine cunoscut în chimia fizică, aparține aceluiași tip de problemă și poate fi studiat în cadrul teoriei propuse de noi dintr-un punct de vedere cu totul nou.

Problema experimentală ridicată de considerentele teoretice expuse anterior este următoarea : este posibil să se „perturbe" substratul unei enzime, astfel încît să nu se altereze structura sa chimică și apoi să se urmărească efectul „perturbației" asupra reacției enzimatice ?

Metoda „perturbării substratului", elaborată de noi, a fost expusă în alt context [3]. Ideea de bază este următoarea : se iradiază diferitele substrate investigate cu radiații X, în *doze infime*, începînd chiar cu 1 rad. Așa cum se poate prevedea, această iradiere ușoară duce la o „perturbație blîndă" (*gentle perturbation*), care exclude radioliza. Într-adevăr, determinări chimice și fizico-chimice pe substratele iradiare arată că este vorba de o adevărată „perturbație cuantică", fără modificări chimice (în contextul nostru, tranzițiile chimice sînt nesemnificative). Într-un mod neașteptat însă, perturbația astfel obținută s-a dovedit metastabilă, semnificativă și extrem de reproductibilă, încît poate fi comod investigată prin determinări enzimatice spectrofotometrice curente.

MATERIAL ȘI METODĂ

Substrate enzimatice : Na-succinat (Carlo Erba) ; Na-piruvat, metionină, Na-glutamat (Merck) ; Na-izocitrat (Fluka) ; Li-lactat (Schuchardt) ; acid DL-malic, xantină monosodică, uree, acid uric (N.B.C.) ; hipoxantină (Serva).

Iradierea s-a făcut cu o instalație Securix G : 160 Kv, 0,5 mm Cu, 0,5 mm Al, în aer, la distanța de 30 cm (substratele, în formă de pulbere, sînt întinse într-un strat de aproximativ 0,5 $\mu g/cm^2$). După „perturbație", toate substratele au fost cercetate printr-o reacție de culoare specifică, de natură neenzimatică (ureea cu diacetil-monoxină, lactatul cu *p*-hidroxidimetil, glutamatul cu dinitrofenil-hidrazină etc.), determinîndu-se spectrofotometric coeficienții de extincție ($E_1^{1\%}$ cm). De asemenea, s-au trasat spectrele în infraroșu ale tuturor substratelor iradiate, în comparație cu martorii.

Tulpini bacteriene. Pentru studiul interacțiunilor cu receptorii celulari, s-au utilizat : o sușă de *E. coli* tip sălbatic, sensibilă și rezistentă la cloramfenicol (CM^s și CM^r), și o mutantă auxotrofă metionin-depen-

dentă (M^-). *E. coli* tipul sălbatic a fost cultivat în extract de carne — Merck (EMB), iar mutanta la metionină într-un mediu sintetic minim (SMM). Culturile de studiat au fost obținute printr-un inocul de 0,1 ml dintr-o cultură de 8 ore, cu o absorbție standardizată de 0,400 la 625 mμ.

Sisteme enzimatice. Ca „aparate de măsură" au fost utilizate fie enzime purificate, fie un preparat mitocondrial standard. S-au utilizat următoarele enzime : uree (E.C. 3.5.1.5.) Merck : 250 000 U/g, uricază (urat-oxidază E.C. 1.7.3.3.) N.B.C. : 45 U/mg, xantin-oxidază (E.C. 1.2.3.2.) Mann : 15 000 U/ml.

Preparatele mitocondriale standard de ficat și rinichi de șobolan au fost obținute după O'Brien [13].

Detaliile experimentale complete sînt date în legenda fiecărui experiment.

REZULTATE

Interacțiunea enzimă-substrat. Rezultatul principal obținut atunci cînd se induce o perturbație cuantică într-un substrat, prin iradiere cu raze X în doze extrem de mici, este următorul : se constată întotdeauna un „prag de perturbație" (de obicei la nivel foarte jos), de la care se obține o „stimulare" a reacției enzimatice. De asemenea, se constată un „prag de inhibiție" (de obicei tot la doze foarte mici), de la care începînd efectul este invers.

Cu toate acestea, dacă se determină ($E^{1\%}_{1\,cm}$) printr-o reacție specifică de culoare, nu se obțin nici un fel de modificări între substratul „perturbat" și cel neiradiat (martor). Același lucru este valabil și pentru spectrele IR.

Fenomenul de *perturbație a substratului*, descris mai sus, este extrem de reproductibil. El a fost obținut pe un mare număr de substrate, „măsurate" atît cu enzime pure, cît și cu fracțiuni subcelulare [3].

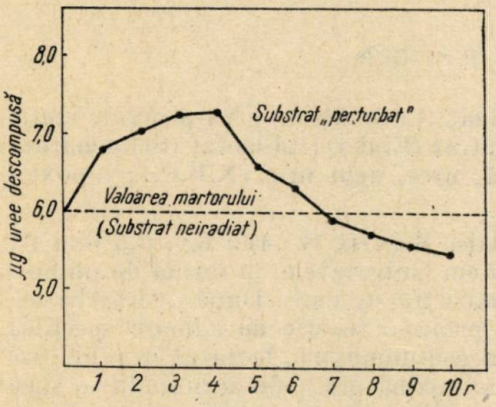


Fig. 1. — Efectul perturbației substratului în reacția cu uree. Mediul de reacție : soluție uree (1 μ g uree Merck : 250 000 E/g în 1 ml tampon fosfat 0,01 M, pH = 8,0), echilibrată la 37°C. Reacția este inițiată cu 10 μ g uree (în 0,1 ml apă distilată) ; după 1 min, reacția este oprită cu 1 ml reactiv fenolic (5 g fenol + 0,025 g nitroprusiat de sodiu. Reacția de culoare se dezvoltă cu 1 ml reactiv hipoclorit (2,5 g NaOH + + 0,2 g % NaOCl). Se determină spectrofotometric la λ = 610 mμ.

Reprezentăm un astfel de experiment în figura 1 (reacție cu uree și în figura 2 (reacție cu preparat mitocondrial).

În lumina acestui prim rezultat se ridică următoarele probleme :

— posibilitatea utilizării fenomenului de „perturbație" a substratului pentru studii cinetice ;

— posibilitatea corelării „perturbației" cu indicii submoleculari (electronici) ai substratului respectiv.

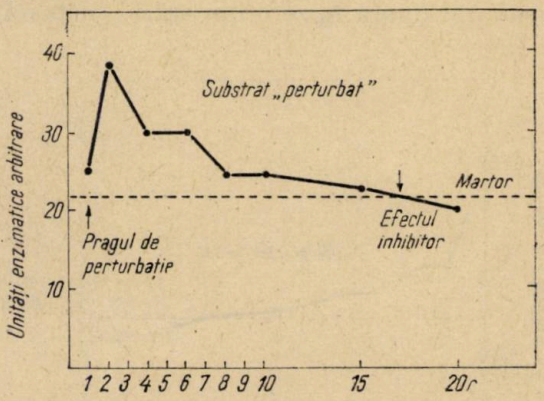


Fig. 2. — Efectul perturbației substratului în reacția izocitric-dehidrogenazei.
Mediul de reacție : tampon Tris-HCl, pH = 7,5, 0,2 μ moli ; DL-izocitrat-Na 0,01 μ moli ; NADP 0,001 μ moli, într-un volum final de 2,9 ml. Reacția este inițiată cu 0,1 ml mitocondrii de ficat de șobolan, standardizate la D · 0 = 0,85. Se determină spectrofotometric la 30 s și la 2 min și 30 s la λ = 340 mμ.

Reprezentăm în figura 3 o experiență de cinetică a reacției ureazice cu substrate perturbate. După cum se vede, efectul de „stimulare" și cel

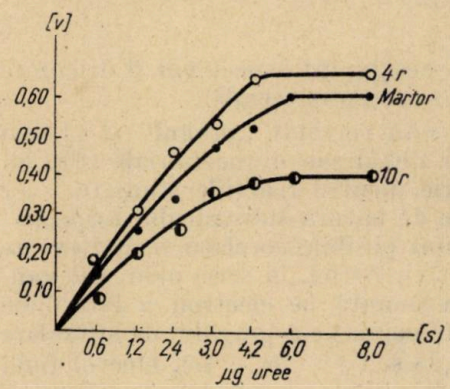


Fig. 3. — Reprezentarea lui [v] vrs [s] pentru substratul perturbat în reacția cu urează. Mediul de reacție : același din figura 1. Vitezele inițiale au fost calculate din curbele absorbției față de timp.

de „inhibiție" se regăsesc și în legătură cu viteza maximă a reacției. Pentru reacția respectivă este posibilă și calcularea parametrilor termodinamici,

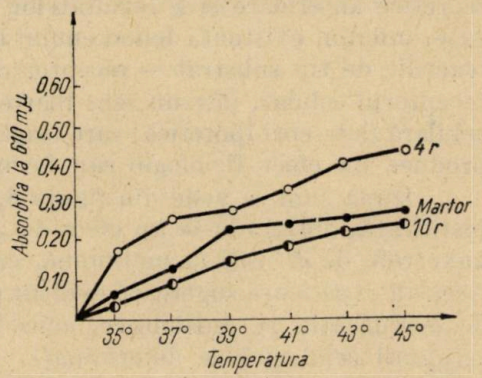


Fig. 4. — Efectul temperaturii asupra substratului perturbat în reacția cu urează. Mediul de reacție : același din figura 1. Reacția este determinată la 30 s.

efectul fiind stabil în limita 35—45°C (fig. 4). Totuși, în sisteme cu electroni π delocalizați (de exemplu reacția acid uric-uricază), efectul din figura 4 nu a putut fi regăsit pe intervale de temperatură peste 39°C.

Efectul de perturbație este cu mult mai stabil decît stările „excitate" obținute în radiochimie prin iradieri cu doze foarte mari. După cum se vede din figura 5, se obțin stări „metastabile" pînă la 7—10 zile. Conse-

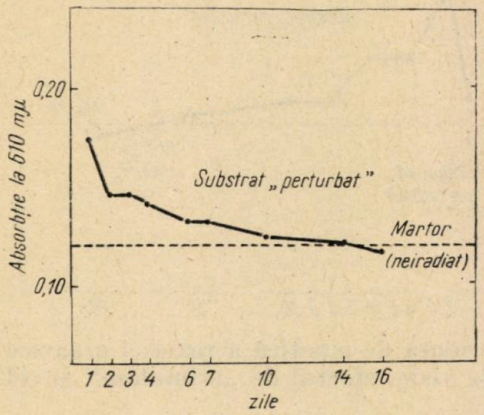


Fig. 5. — Stabilitatea în timp a efectului de perturbație asupra ureei. Substratul perturbat a fost ținut, sub formă de pulbere, la —30°C. Condițiile experimentale ca în figura 1.

cințele practice ce pot deriva din acest neașteptat aspect vor fi discutate în legătură cu interacțiunile substrat — receptor celular.

În legătură cu al doilea aspect s-au cercetat „pragul" și nivelul de perturbație pentru substratele unor dehidraze mitocondriale (fig. 6). După cum se putea prevedea din teorie, pentru reacțiile studiate, s-au obținut valori foarte variate, în funcție de natura substratului respectiv. O cercetare mai detaliată a arătat că sînt posibile corelații și mai exacte în legătură cu indicii electronici respectivi. Astfel, în seria acid uric-xantină-hipoxantină, a cărei energie de rezonanță pe electron π este bine cunoscută [14], se constată o interesantă corelație a pragului de stimulare cu energia de rezonanță (0,21—0,25—0,28 și 1 r — 3r — 4r), efectul fiind invers pentru pragul de inhibiție (fig. 7).

Interacțiunea substrat — receptor celular. Pe baza considerentelor teoretice anterioare și a rezultatelor privind reacțiile enzimatice investigate, inferăm existența fenomenului de „perturbație a substratului" și în reacțiile de tip substrat — receptor celular. În contextul nostru, definim receptorul celular, într-un sens foarte larg, după Ariëns [1], ca o entitate celulară (adeseori ipotetică) care leagă un agent chimic și care, ca rezultat, produce un efect fiziologic sau farmacologic.

După cum se vede din figura 8, aserțiunea noastră de mai sus este justificată, obținîndu-se un efect de „stimulare" a creșterii unei mutante auxotrofe de *E. coli* la metionină, crescută pe un substrat „perturbat". Această experiență sugerează evident posibilitatea investigării fenomenului de perturbație pe antibiotice, considerate ca substrate specifice pentru receptori celulari bine determinați.

Apriori, se poate postula un rezultat *in vitro* pentru un sistem de tip antibiotic — enzimă, întru totul similar rezultatelor obținute pe sistemele substrat „perturbat" — enzimă.

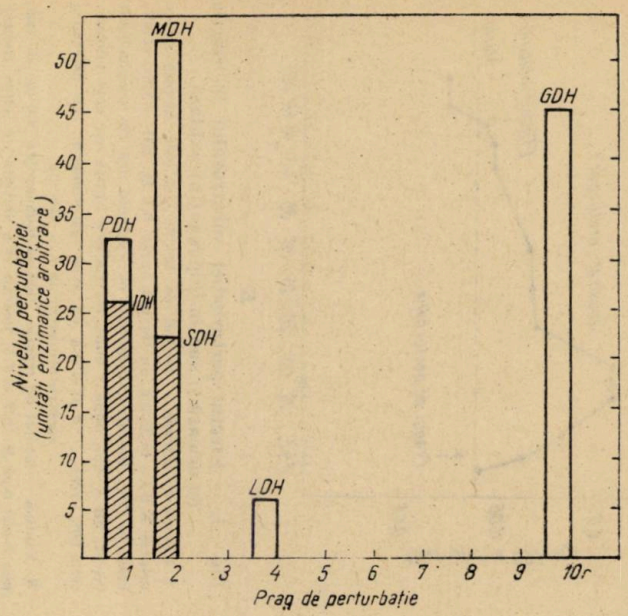
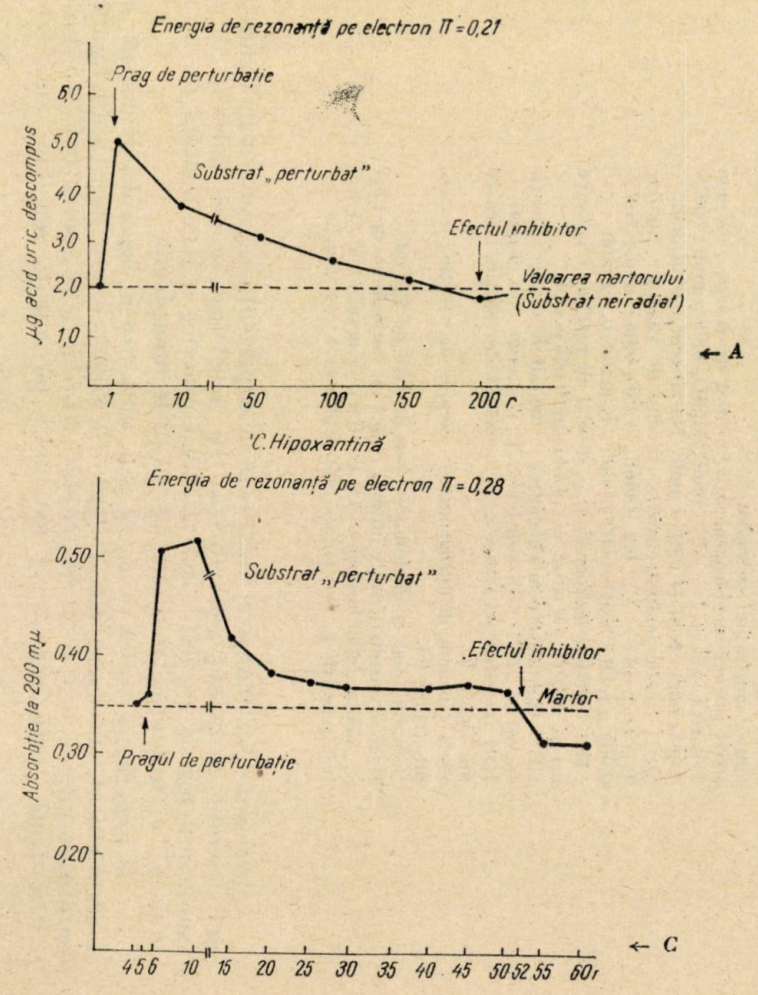


Fig. 6. — Doza „pragului de perturbație" pentru efectul stimulator în reacțiile dehidrogenazelor mitocondriale.
Gradul de perturbație (exprimat în unități enzimatice arbitrare) reprezintă procentul „stimulării", comparat cu valoarea martorului neiradiat.
PDH (piruvic-dehidrogenaza) — mediul de reacție : tampon Tris-HCl, pH = 7,5, 0,2 μ moli ; $MgSO_4$ 0,06 μ moli ; NaCN 0,03 μ moli ; NADH 0,01 μ moli ; Na-piruvat 0,02 μ moli.
MDH (malic-dehidrogenaza) — mediul de reacție : tampon Tris-HCl, pH = 7,5, 0,2 μ moli ; $MgSO_4$ 0,06 μ moli ; NaCN 0,009 μ moli ; NAD 0,002 μ moli ; K-malat 0,1 μ moli.
LDH (decticla-hidrogenaza) — mediul de reacție : identic cu cel al MDH ; ca substrat : Li-lactat 0,016 μ moli.
GDH (glutamic-dehidrogenaza) — mediul de reacție : identic cu cel al MDH ; ca substrat : Na-glutamat 0,01 μ moli.
IDH (izocitric-dehidrogenaza) — mediul de reacție : același din figura 2.
SDH (succinic-dehidrogenaza) — mediul de reacție : același din figura 11.
Volumul final al mediului de reacție este de 2,9 ml.
Reacția enzimatică este inițiată cu 0,1 ml mitocondrii de ficat de șobolan, standardizate la D.O = 0,85 și determinată spectrofotometric la 30 s și la 2 min și 30 s la $\lambda = 340$ m μ.

Această aserțiune este justificată de experiența reprodusă în figura 9 pe sistemul penicilină-penicilinază. În acest caz apare imediat, ca o consecință logică, posibilitatea utilizării practice a fenomenului de „stimulare" a antibioticelor direct pe culturile microbiene.

O experiență tipică de acest gen, obținută în laboratorul nostru pe cloramfenicol, este reprodusă în figura 10. După cum se observă din figură, se obține un rezultat total neașteptat. Antibioticul „perturbat" cu doza „stimulantă" este într-adevăr mai activ pe cultura sensibilă, dar este



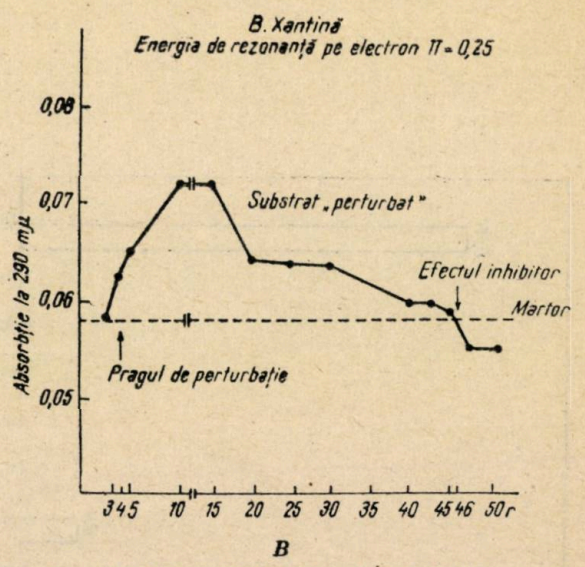


Fig. 7. — Efectul perturbației substratului în reacția cu uricază și xantin-(hipoxantin)-oxidază.

A. Reacția cu uricază — mediul de reacție: soluție uricază (5 µg uricază N.B.C. 45 U/mg. în tampon borat 0,1 M, pH = 8,5), echilibrată la 37°C. Reacția este inițiată cu 5 µg acid uric (în tampon borat 0,1 M, pH = 8,5); după 1 min., reacția este oprită cu acid tricloracetic 20%, rece și dezvoltată cu acid fosfotungstic. Se determină spectrofotometric la λ = 610 mµ.

B. Xantină — mediul de reacție: xantină monosodică 200 µg în tampon fosfat 0,05 M, pH = 7,5. Reacția este inițiată în cuva spectrofotometrului Beckman model DU, la 25°C, cu xantin-oxidază 15 U, timp de 1 min și determinată la λ = 290 mµ.

C. Hipoxantină — mediul de reacție: hipoxantină 200 µg în tampon fosfat 0,05 M, pH = 7,5. Reacția este inițiată în cuva spectrofotometrului Beckman model DU, la 25°C, cu xantinoxidază 15 U, timp de 1 min și determinată la λ = 290 mµ.

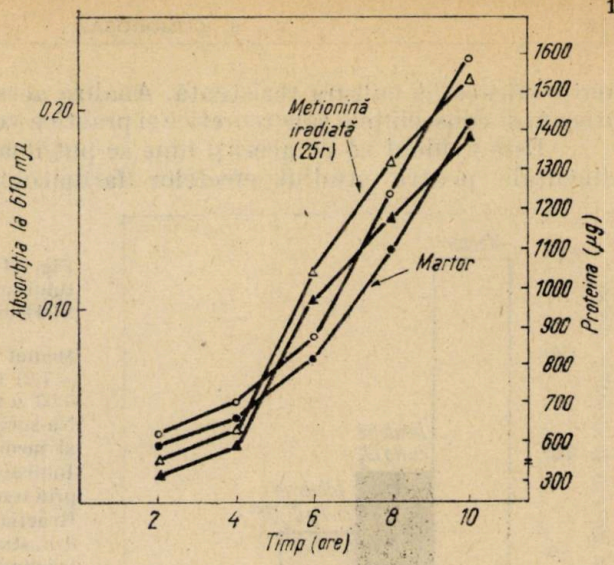


Fig. 8. — Creşterea unei mutante auxotrofe de *E. coli* metionin-dependentă (M^-) pe mediu cu metionină „normală" şi „perturbată". Cultura a fost obţinută în 10 ml SMM : glucoză 10 g/l, metionină 10 mg/l, triptofan, asparagină, acid glutamic şi glicină 20 μ g/ml, biotină şi acid pantotenic 1 μ g/ml ; tampon fosfat 0,045 M, pH = 7,4.
Densitate optică — O, ●; proteină celulară — Δ, ▲ ; măsurate la 8 ore.

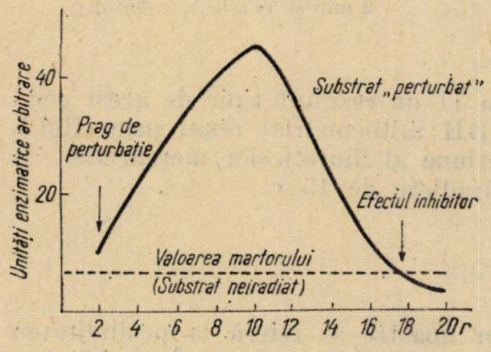


Fig. 9. — Efectul perturbaţiei substratului în reacţia cu penicilinază.
Mediul de reacţie : penicilină G-potassium 0,15 μ M în tampon fosfat 0,05 M, pH = 5,8. Reacţia este iniţiată în cuva spectrofotometrului Beckman model B, cu penicilinază (N.B.C.) 0,5 U/ml şi determinată la 2 min la λ = 620 m μ, după tehnica lui Novick [2].

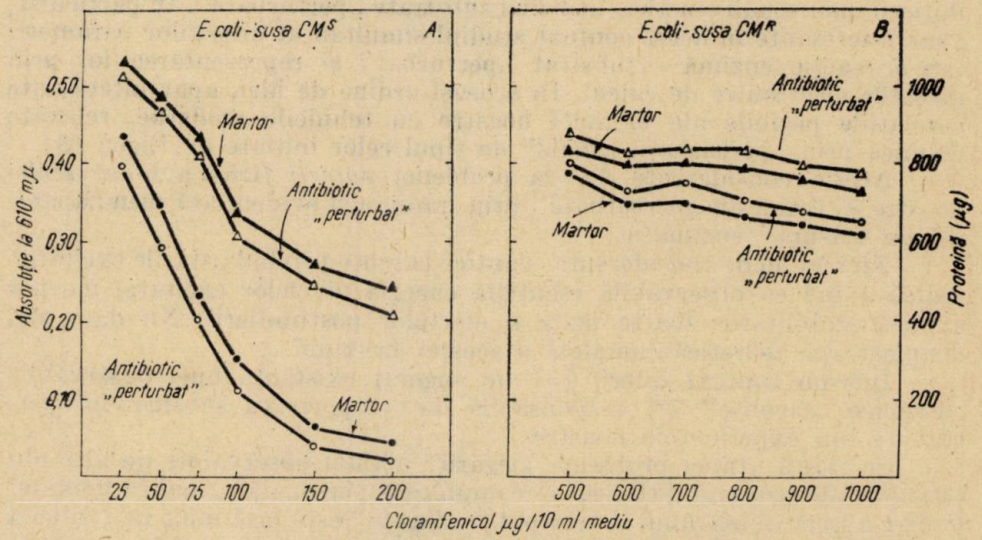


Fig. 10. — Efectul perturbaţiei substratului asupra activităţii antimicrobiene a cloramfenicolului. Cloramfenicolul a fost „perturbat" prin iradiere cu raze X în doză de 6 r şi testat pe *E. coli*, suşă senzitivă şi rezistentă (CM^S şi CM^r). Culturile au fost obţinute în 10 ml EMB cu inocul de 0,1 ml dintr-o cultură de 8 ore. Densitate optică — O, ●; proteină celulară — Δ, ▲ ; determinate la 8 ore.

mai ineficace pe cultura rezistentă. Analiza acestui fenomen cu totul nou, precum și consecințele sale teoretice și practice vor fi prezentate la discuții.

Este evident că pe aceeași linie se pot imagina variate modele experimentale pentru studiul efectelor farmacologice ale medicamentelor

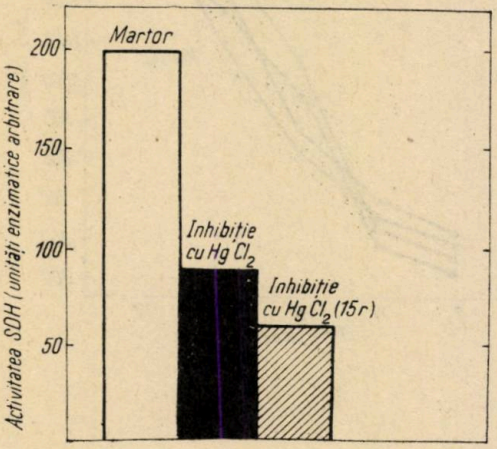


Fig. 11. — Efectul perturbației substratului în reacția de inhibare a activității SDH din mitocondria de rinichi de șobolan de către $HgCl_2$.
Mediul de reacție: tampon fosfat (pH = =7,2) 0,02 μ moli; NaCN (pH = 7,8) 0,03 μ moli; $K_3Fe(CN)_6$ 0,03 μ moli; Na-succinat 0,04 μ moli. Volumul final al mediului de reacție este de 2,9 ml. Inhibare cu 1 mM $HgCl_2$, „perturbată" prin iradiere cu raze X în doză de 15 r. Reacția este inițiată cu 0,1 ml mitocondrii, standardizate la D.O = 0,85, și determinată spectrofotometric la 30 s și la 2 min și 30 s la λ = 400 mμ.

„perturbate". Reprezentăm în figura 11 un rezultat tipic de acest gen: creșterea efectului de inhibare a SDH mitocondrial renal prin $HgCl_2$ (efect implicat în mecanismul de acțiune al diureticelor mercuriale), în urma „perturbării" drogului cu o iradiere de 15 r.

DISCUȚII

Un prim aspect al rezultatelor noastre se referă la posibilitatea inițierii unor studii cinetice, utilizînd substrate „perturbate". În particular, apar interesante în acest context studiul simultan al diferiților parametri într-o reacție enzimă — substrat „perturbat" și reprezentarea lor prin mașinile electronice de calcul. În aceeași ordine de idei, apar interesante corelațiile posibile ale metodei noastre cu tehnicile moderne, relaxare chimică prin „perturbații rapide" de tipul celor inițiate de Eigen [8].

Aceste considerente duc la problema *naturii fizice* a observabilei noastre $\mathcal{J}$, care este „perturbată" prin iradiere și evidențiată prin „aparatul de măsură" enzimatic.

Nici un fel de considerente cuantice curente privind „stările excitate" (adică avînd ca observabilă esențială energia nivelelor excitate) nu pot explica stabilitatea foarte mare a efectelor postiradierii. Nu dăm aici demonstrația teoretică completă a acestei aserțiuni.

Într-un context diferit [3] am sugerat existența unei observabile entropice „ascunse" $\mathcal{J}^*$, responsabilă de comportarea substratelor perturbate din experiențele noastre.

Se ridică atunci problema „legării" acestei observabile de alte observabile ale sistemului (Rosen — comunicare personală). Analiza modului în care observabilele unui sistem pot fi „legate" este însă mult mai dificilă și nu intenționăm a continua discuția aici. Într-un context diferit [4] am încercat un studiu preliminar în legătură cu posibilitatea reprezentării

observabilelor cuantice într-un sistem biologic abstract. Evident, reprezentarea fizico-chimică concretă trebuie să plece de la efectul de „stimulare" a substratelor. În legătură cu aceasta, un punct de vedere modern a fost expus de Matsen și Cantu [10]. O „legătură" a observabilei noastre entropice $\mathcal{J}^*$ cu densitatea spinului electronului neîmperechiat (care în concepția autorilor de mai sus poate fi legată de valență) apare teoretic posibilă. În această direcție, studii de susceptibilitate magnetică și rezonanță magnetică nucleară pe substratele „perturbate" sînt în curs în laboratorul nostru.

Demonstrarea efectului de „perturbație a substratului" în antibiotice ridică o serie de probleme biologice importante. Efectul pe tulpinile sensibile este normal, în contextul nostru receptorul celular (în cazul de față mARN — proteina ribozomală) prezentînd o cinetică mai eficientă (adică o legare mai rapidă) față de antibioticul „perturbat" comparativ cu cel neiradiat.

Efectul pe tulpinile rezistente devine clar, în același context, dacă se presupune în acest caz existența unor enzime celulare, care „observă" antibioticul „perturbat" de o manieră *competitivă*, adică prezentînd o cinetică de legare mai eficientă în comparație cu respectivul receptor celular.

În acest caz, este interesantă de remarcat analogia cu teoria enzimatică a rezistenței microbiene [23], derivată de noi pe considerente cu totul diferite.

Într-un alt context [5] am dat o demonstrare experimentală a acestui punct de vedere, izolînd pentru unele tulpini rezistente enzimele prevăzute de teorie.

În încheiere, dorim să menționăm unele probleme epistemologice ridicate de „procesul de măsură" în sens cuantic. Pe plan strict fizic, problema este extrem de actuală [26]. Pe plan biologic, ea prezintă o serie de dificultăți, pornind de la necesitatea definirii univoce a „concentrației biologice" [6] pînă la necesitatea unei teorii a comportării dinamice a sistemelor biologice. Astfel, este clar că o serie de fenomene studiate în biologie nu sînt altceva decît subsisteme ale unor sisteme mai largi, generate de observabilele ce ne sînt mai ușor accesibile experimental. Dar atunci accesibilitatea unor observabile particulare ale sistemului nu este *intrinsecă* sistemului, ci mai degrabă o consecință a naturii *interacțiunii noastre* cu el [21]. Rezultă că, schimbînd *modul* de interacțiune cu sistemul de studiat (mai degrabă decît analizîndu-l în subdetalii cu metodologia existentă), se pot scoate la iveală observabile „noi".

Experiențele noastre privind observabila „ascunsă" $\mathcal{J}^*$ reprezintă un exemplu al acestui nou și provocator punct de vedere.

Autorul mulțumește prof. R. Rosen de la Centrul de biologie teoretică a Universității statului New York (Buffalo) pentru numeroasele discuții stimulante privind posibilitatea introducerii mecanicii cuantice în biologie, ca și pentru vastul material teoretic pus la dispoziție înaintea publicării lui.

Prezentată la redacție la 28 septembrie 1968

Laboratorul central de biochimie,
Spitalul clinic Fundeni

BIBLIOGRAFIE

1. ARIËNS E. J., *Molecular Pharmacology*, vol. I, Academic Press, New York, 1964, p. 119.
2. COMOROŞAN S., PLATICA O., Bull. Math. Biophys., **29**, 665 (1967).
3. COMOROŞAN S., Enzymologia, ... (1968) (sub tipar).
4. COMOROŞAN S., BAIANU I., Bull. Math. Biophys., **31**, ... (1969) (sub tipar).
5. COMOROŞAN S., VIERU S., J. Bact. ... (1969) (în curs de publicare).
6. COMOROŞAN S., PLATICA O., Bull. Math. Biophys., **30**, 123 (1968).
7. DE WITT C., în *Relativity, Groups and Topology*, Blackie & Son, Ltd., Londra, 1964, p. 600.
8. EIGEN M., DE MAEYER L., *Technique of Organic Chemistry*, Interscience Publishers, Inc., New York, 1963, vol. VIII, p. 895.
9. HAMMES G. C., Nature, Lond., **204**, 4956 (1964).
10. MATSEN F. A., CANTU A. A., J. Phys. Chem., **72**, 21 (1968).
11. NEUMANN J. VON, *Mathematical Foundations of Quantum Mechanics*, Princeton University Press, 1955.
12. NOVICK R. P., Biochem. J., **83**, 236 (1962).
13. O'BRIEN T. W., KALF G. F., J. biol. Chem., **242**, 2172 (1967).
14. PULLMAN B., PULLMAN A., *Quantum Biochemistry*, Interscience Publishers, Inc., New York, 1963.
15. RASHEVSKY N., Bull. Math. Biophys., **21**, 309 (1959).
16. RASHEVSKY N., Bull. Math. Biophys., **23**, 237 (1961).
17. RASHEVSKY N., Bull. Math. Biophys., **26**, 187 (1964).
18. ROSEN R., Bull. Math. Biophys., **22**, 227 (1960).
19. ROSEN R., Bull. Math. Biophys., **23**, 393 (1961).
20. ROSEN R., Bull. Math. Biophys., **25**, 183, (1963).
21. ROSEN R., Bull. Math. Biophys., **30**, ... (1968) (sub tipar).
22. TINKHAM N., *Group Theory and Quantum Mechanics*, Mc Graw-Hill Book Company, New York, 1966.
23. WATANABE T., Bact. Rev., **27**, 89 (1963).
24. WEYL H., *Gruppentheorie und Quantenmechanik*, S. Heizel Verlag, Leipzig, 1928.
25. WIGNER E., în *Symmetries and Reflections*, Indiana University Press, 1967, p. 200.
26. WIGNER E., în *Symmetries and Reflections*, Indiana University Press, 1967, p. 153.

QUANTUM PHENOMENA IN BIOLOGY. A NEW THEORETICAL AND EXPERIMENTAL APPROACH

SUMMARY

A quantum theoretical approach to the mechanism of specific interactions in biological systems is presented. A "substrate information" observable $\mathcal{J}$, is assumed to carry the physical attribute which corresponds to the "affinity" between the substrate and its corresponding receptor. A microphysical "measuring apparatus" identified as the enzyme (or more generally the cellular receptor) will specify the eigenvalues of this observable $\mathcal{J}$, on any particular quantum states Ψ_i.

A theoretical analysis of the various types of mathematical structure that the $\mathcal{J}$-observable can possess and the possible effects which can arise from each such structure in connection with enzymological reactions is developed.

A direct experimental evidence of the above theoretical picture is given. A "substrate perturbation" method was developed utilizing very

low X-ray irradiation of different biochemical substrates in such a way as not to alter their chemical structure. Nevertheless, these "perturbed substrates" showed significant kinetic changes, according to the predications of the theory. A series of reagents (urea, uric acid, xanthine, hypoxanthine) were investigated in this respect. A "stimulation" of the corresponding enzymic reactions was recorded at very gentle "perturbations" ranging from 1 r. Likewise, a "threshold perturbation" is attained, when the effect turns opposite.

An interesting correlation between the resonance energy per π electron in the uric acid-xanthine-hypoxanthine series and the "threshold perturbation dose" for the stimulation and inhibition effects in the same series was recorded.

ST. CERC. BIOCHIM., 12, 2, 153—155 (1969)

CAPACITATEA DE A FIXA ROȘUL DE CONGO A PROTEINELOR SERICE DENATURATE ÎN PREZENȚA ZAHAROZEI

ȘTEFAN CSÖGÖR și MEDARD KEREKES

Rezumat. Modificările macrostructurii proteinelor serice sub acțiunea căldurii, care au ca urmare scăderea capacității acestora de a fixa roșul de Congo, se desfășoară practic în intervalul de temperatură de 64—72°C. Zaharoza exercită un efect protector asupra proteinelor, în prezența ei modificările instalîndu-se la temperaturi mai înalte.

Un grup important de substanțe cu acțiune protectoare față de denaturarea proteinelor sînt zaharurile. Efectul protector al zaharurilor s-a urmărit prin studierea activității enzimatice [1]—[3], a stabilității față de precipitarea cu săruri neutre [4], a proprietăților antigenice [5], a creșterii numărului de grupări sulfhidrilice libere [6], precum și a mobilității electroforetice [7] în diferite condiții de denaturare. Prin aceste cercetări s-a stabilit că există diferențe în privința efectului protector al zaharurilor, dizaharidele fiind mai eficace decît monozaharidele. Nu s-a explicat însă în mod satisfăcător mecanismul prin care zaharurile exercită acest efect protector.

În lucrarea de față ne-am propus să studiem efectul protector al zaharozei față de denaturarea prin căldură a proteinelor serice, urmărind capacitatea acestora de a fixa roșul de Congo, care variază în funcție de gradul denaturării [8], [9].

MATERIAL ȘI METODĂ

La 0,5 ml ser uman normal s-au adăugat 1,5 ml apă distilată, respectiv soluția de zaharoză în apă distilată, astfel ca concentrația finală a zaharozei să fie de 1M. Soluțiile s-au încălzit timp de 10 min la temperatura de 30, 40, 50, 60, 64, 68, 72, 76, 80, 90 și 100°C, după care s-au răcit sub robinet timp de 30 s; 0,2 ml din soluția proteică s-au adăugat la 5 ml soluție de roșu de Congo 0,1%, după 10 min s-au mai adăugat 5 ml soluție saturată de NaCl (aproximativ 36%), iar după un repaus de 24 de ore la temperatura camerei soluția a fost filtrată prin două hîrtii de filtru (Filtrak 390). Extincția filtratului care conține roșu de Congo fixat de proteine s-a determinat la fotometrul Pulfrich, în cuva de 1 cm, cu filtrul S 53, după o diluție de 6 ori.

REZULTATE

Din figura 1, în care se prezintă rezultatele obținute, reiese că scăderea capacității proteinelor serice de a fixa roșul de Congo se instalează destul de brusc la temperatura de 64°C. Modificările structurale ale proteinelor, care duc la scăderea capacității acestora de a fixa colorantul, se desfășoară practic în intervalul de temperatură de 64—72°C, peste aceasta ele fiind neglijabile. În prezența zaharozei, limita de temperatură la care se instalează denaturarea crește la 68°C, iar la 72°C denaturarea încă nu este atît de avansată ca la probele fără zaharoză.

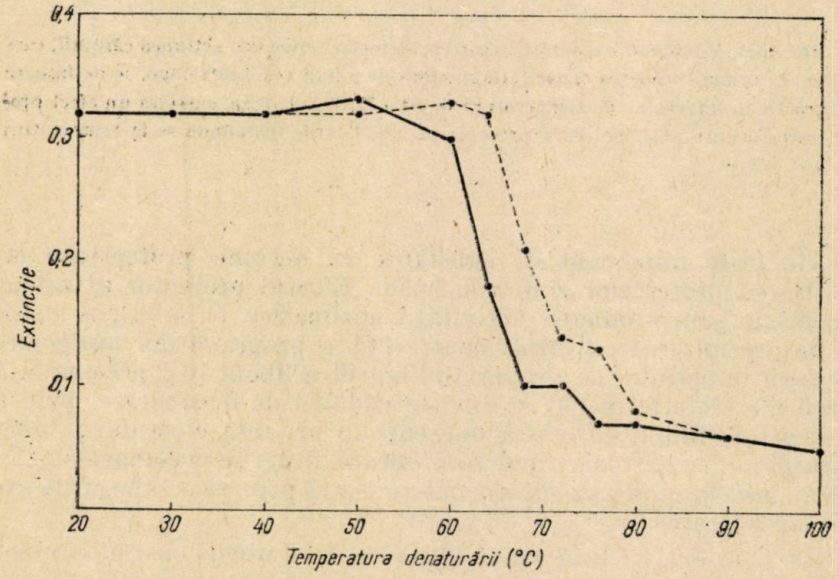


Fig. 1. — Variația cu temperatura a capacității proteinelor serice de a fixa roșul de Congo.

Linia continuă = fără zaharoză. Linia întreruptă = cu zaharoză.

Se constată deci că zaharoza exercită un efect protector și asupra capacității de fixare a roșului de Congo de către proteinele supuse denaturării prin încălzire. Acest efect se explică, după părerea noastră, prin izolarea moleculelor proteice unele de altele de către moleculele zaharozei, dar și prin stabilizarea macrostructurii moleculelor proteice. Interacțiunea moleculelor de zaharoză cu cele ale apei, prin sustragerea unei părți a apei de hidratare a proteinei, poate să aibă ca urmare întărirea legăturilor de hidrogen din moleculele acestora din urmă.

Academia Republicii Socialiste România,
Baza de cercetări științifice
Tg.-Mureș

Prezentată la redacție în 2 octombrie 1968

BIBLIOGRAFIE

1. H. Luers, P. Lorinser, Biochem. Z., **144**, 212 (1924).
2. A. Oparin, S. Manskaia, Biochem. Z., **260**, 170 (1933).
3. M. Kerekes, P. Furda, St. cerc. biochim., **8**, 199 (1965).
4. A. Beilinson, Biochem. Z., **213**, 399 (1929).
5. L. A. Zilber, *Bazele imunologiei*, Edit. medicală, Bucureşti, 1959, p. 257.
6. C. D. Ball, C. R. Hardt, W. J. Duddles, J. biol. Chem., **151**, 163 (1943).
7. M. Kerekes, St. cerc. biochim., **6**, 245 (1963).
8. F. Haurowitz, D. Dimoira, S. Tekman, J. amer. chem. Soc., **74**, 2263 (1952).
9. Şt. Csögör, M. Kerekes, Naturwis enschaften, **52**, 540 (1965).

THE CONGO-RED BINDING CAPACITY OF SERUM PROTEINS DENATURED IN THE PRESENCE OF SUCROSE

SUMMARY

The macrostructural changes of serum proteins which occur under the action of heat and which result in a decrease of the Congo-red binding capacity, practically take place in the range of 64—72°C. Sucrose exerts a protective action on serum proteins, namely in its presence, modifications occur at higher temperatures.

ST. CERC. BIOCHIM., 12, 2, 157—162 (1969)

COMPORTAREA GRUPĂRILOR FENOLICE MASCATE ALE TRIPSINEI SUB ACȚIUNEA DENATURANȚILOR

POMPILIA FURDA, A. KOVACS și M. KEREKES

Rezumat. S-a studiat comportarea grupărilor fenolice tirozinice mascate din tripsină sub acțiunea denaturării prin căldură, cu uree, dodecilsulfat de sodiu (DSS), acid clorhidric și NaOH. Paralel s-a urmărit și acțiunea acestora asupra activității enzimatice. Ureea provoacă creșterea cu 38,2% a intensității reacției de culoare Folin-Ciocâlteu față de cea a tripsinei native, acidul clorhidric cu 26%, NaOH cu 14,5% și căldura cu 12,2%. DSS nu numai că nu provoacă creșterea cantității grupărilor fenolice, dar chiar reduce intensitatea reacției de culoare. Între acțiunea de evidențiere a grupărilor fenolice mascate și aceea de afectare a acțiunii enzimatice nu există un paralelism. Se pare că grupările fenolice mascate nu au nici un rol în activitatea enzimatică.

Grupările fenolice tirozinice din proteinele native dau cu reactivul Folin-Ciocâlteu o colorație mai slabă decît cele din proteinele denaturate. Această observație a dus la concluzia că în proteinele native grupările fenolice tirozinice se găsesc parțial sub o formă mascată.

Crammer și *Neuberger* [1] explică această mascare prin faptul că între grupările —OH ale tirozinei și grupările —COOH ale altor aminoacizi din proteine pot exista legături de hidrogen.

Sizer și *Peacock* [11] consideră mai probabilă legătura de hidrogen dintre grupările —OH tirozinice și grupările aminice. Ambele păreri au fost confirmate de *Russel* și *Cowgill* [10].

Cercetări în vederea punerii în evidență a grupărilor —OH tirozinice mascate s-au efectuat cu o serie de proteine, folosindu-se ca agent denaturant, în general, ureea. Cu excepția ribonucleazei, nu am găsit date referitoare la existența, respectiv comportarea, grupărilor fenolice mascate din proteine cu proprietăți enzimatice.

În lucrarea de față ne-am propus să cercetăm în ce măsură există grupări —OH tirozinice mascate în tripsină și în ce măsură ele pot fi puse în evidență prin denaturare, folosind diferiți agenți denaturanți și urmărind în paralel și acțiunea acestora asupra activității enzimatice.

MATERIAL ȘI METODĂ

Am utilizat tripsină cristalizată N. B. Co, dizolvată în tampon fosfat 0,066 M, cu pH = 7,8, respectiv în apă distilată.

Soluția de proteină a fost supusă agenților denaturanți timp de 5, 10, 20 și 60 min, concentrația proteinei fiind în toate cazurile identică (0,66 mg/ml). Ca agenți denturanți am ales :

a) *căldură* — soluția apoasă a fost supusă încălzirii la 100°C ;
b) *alcalii* — am folosit NaOH în concentrația 0,33 N ;
c) *uree* — în concentrația 8 M ;
d) *detergent* — dodecilsulfat de sodiu (DSS) în concentrația 0,1 M.

Denaturările cu NaOH, uree și DSS s-au efectuat la temperatura de 23°C. De asemenea, am studiat și efectul simultan al căldurii și al NaOH.

Într-o experiență am încălzit tripsina în prezența NaOH, provocînd astfel o hidroliză parțială.

Determinarea grupărilor —OH am efectuat-o cu reactivul Folin-Ciocâlteu. Se cunoaște că viteza de dezvoltare a culorii este în funcție de pH-ul și temperatura soluției [8]. În metoda originală a lui *Herriott* [5], cu toate că pH-ul final s-a menținut la o valoare bine definită, nu s-a acordat atenție menținerii constante a pH-ului în tot cursul determinării. Adăugarea reactivului Folin-Ciocâlteu provoacă scăderea considerabilă a pH-ului, ceea ce ar putea constitui deja, în sine, cauza unei transformări conformaționale a proteinelor. S-a evitat acest neajuns, menținîndu-se în tot timpul determinării un mediu bine stabilizat, pH-ul variind între 8,5 și 9,5, valoarea finală fiind de 8,7. De asemenea s-au menținut constante atît temperatura, cît și timpul de dezvoltare a culorii.

Reacția de culoare s-a efectuat în modul următor : la 2 ml soluție (conținînd 0,66 mg/ml tripsină nativă, respectiv denaturată) s-au adăugat 5 ml tampon borax 0,05 M, cu pH = 9,5 și 0,2 ml reactiv Folin-Ciocâlteu, trecînd imediat soluția la 40°C timp de 30 min și citind apoi extincția cu filtrul S-61, la fotometrul Pulfrich. Rezultatele s-au comparat cu cele obținute cu tripsină nativă.

În condițiile determinării, creșterea extincției, survenită sub acțiunea denaturării, se datorește apariției unor noi grupări —OH, capabile să reacționeze cu reactivul Folin-Ciocâlteu. Efectuînd reacția de culoare cu tirozină, am obținut o liniaritate strictă între extincție și concentrație.

În continuare, am determinat și activitatea enzimatică a tripsinei, supusă acțiunii acelorași denaturanți, în aceleași condiții, folosind ca substrat soluție de cazeină în concentrația de 2%. Reacția de culoare după tripsinoliză am efectuat-o tot cu reactivul Folin-Ciocâlteu în modul următor : la 1 ml soluție de cazeină am adăugat 1 ml tripsină, trecînd imediat amestecul la 40°C. După exact 10 min s-au introdus 2 ml acid tricloracetic 6% ; la 1 ml filtrat s-au adăugat 5 ml H_2O, 0,2 ml reactiv Folin-Ciocâlteu, 1 ml NaOH N, iar după 5 min extincția s-a citit cu filtrul S-61. Rezultatele obținute la tripsinoliză cu tripsină denaturată au fost comparate cu cele obținute cu tripsină nativă.

REZULTATE

Rezultatele experimentale sînt reprezentate grafic în figurile 1 și 2. Analizînd efectul diferiților agenți denaturanți asupra comportării grupărilor fenolice, putem constata următoarele :

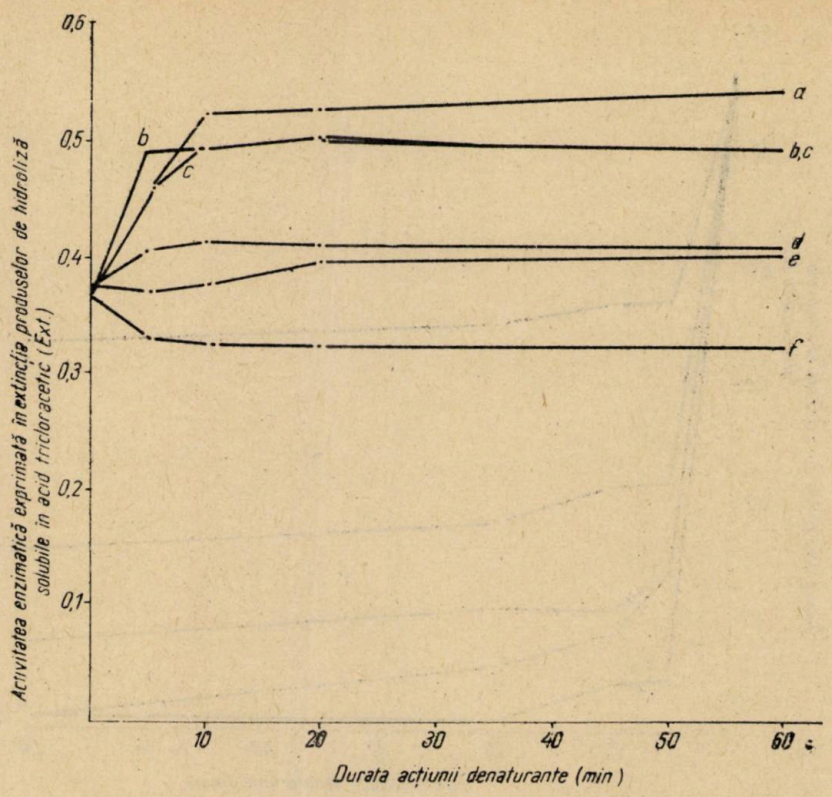


Fig. 1. — Efectul diferiților denaturanți de evidențiere a grupărilor fenolice mascate din tripsină

a — căldură + NaOH; *b* — uree; *c* — acid; *d* — căldură; *e* — NaOH; *f* — detergent.

Capacitatea agenților denaturanți de a demasca grupările —OH tirozinice este diferită de la un denaturant la altul. Considerînd valoarea cromogenă a tripsinei native ca fiind 100%, obținem următoarele creșteri maxime :

căldură ... 12,2%
NaOH ... 14,5%
HCl 26%
căldură + NaOH ... 45%
uree ... 38,2%

Efectul cel mai pronunțat asupra grupărilor fenolice mascate îl prezintă ureea ; căldura, acidul clorhidric și NaOH au un efect mai moderat.

În cursul acțiunii simultane a căldurii și NaOH, care provoacă o hidroliză parțială a tripsinei, s-a ajuns la o creștere cu 45% a intensității reacției de culoare, deci mai mare decît în cazul agenților denaturanți folosiți individual, ca mai sus. Desigur că în acest din urmă caz nu mai este vorba de o simplă denaturare.

În schimb, DSS nu numai că nu provoacă creșterea numărului grupărilor fenolice reactive, ci chiar reduce intensitatea reacției de culoare cu 9,4%.

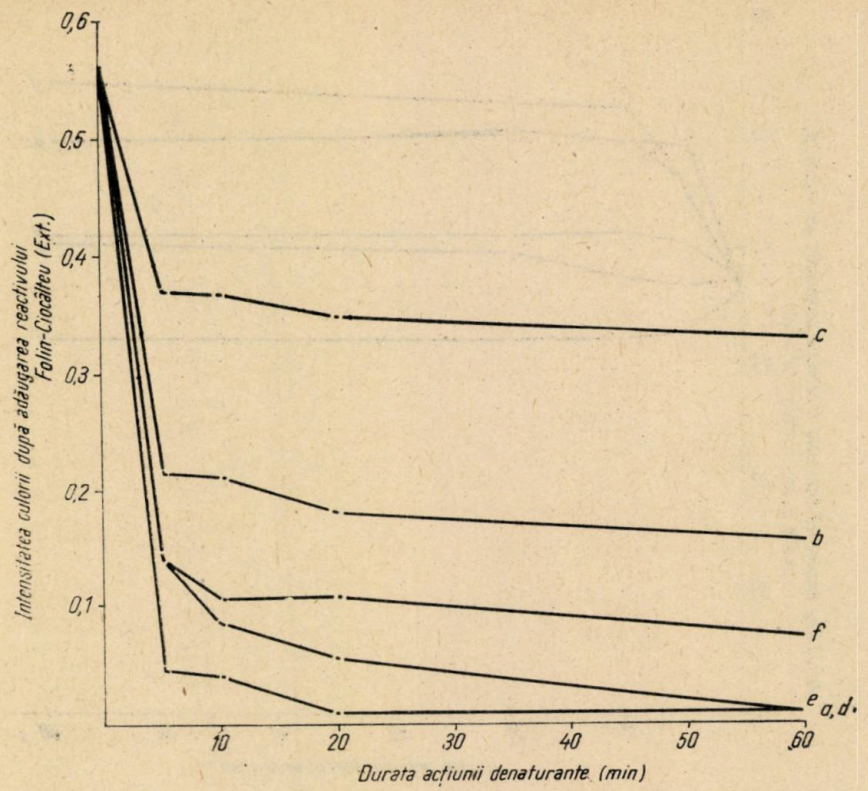


Fig. 2. — Efectul denaturanților asupra activității enzimatice a tripsinei.
a — căldură + NaOH; *b* — uree; *c* — acid; *d* — căldură; *e* — NaOH; *f* — detergent.

Evoluția în timp a apariției unor noi grupări fenolice, decelabile cu reactivul Folin-Ciocâlteu, variază în funcție de denaturant. Acțiunea ureei se instalează aproape instantaneu, pe cînd acțiunea acidului clorhidric, a NaOH și a căldurii se desfășoară în timp, valorile maxime fiind atinse după aproximativ 20 min. Efectul contrar al DSS se instalează și el aproape instantaneu.

Urmărind acțiunea denaturanților asupra activității enzimatice, am constatat următoarele : acidul clorhidric produce o scădere relativ ușoară a activității, rezistența tripsinei față de acizi fiind de altfel cunoscută. Nici ureea nu are un efect prea puternic. NaOH are un efect mult mai pronunțat. Efectul cel mai puternic îl manifestă încălzirea, și este interesant că el coincide cu acela al acțiunii simultane a căldurii — NaOH, cînd se produce și o hidroliză parțială.

Detergentul, cu toate că nu provoacă o demascare a grupărilor fenolice, reduce puternic activitatea enzimatică.

Se constată deci că nu există un paralelism între acțiunea de evidențiere a grupărilor fenolice mascate și aceea de afectare a acțiunii enzimatice. De aici concluzia că grupările fenolice mascate nu au probabil, un rol în activitatea enzimatică.

DISCUȚII

Creșterea intensității reacției de culoare se datorește, fără îndoială, deplierii în mai mică sau mai mare măsură a lanțului polipeptidic în urma denaturării. În consecință, devin accesibile reactivului Folin-Ciocâlteu și acele grupări fenolice care mai înainte, din motive sterice, nu au fost în stare să reacționeze. Trebuie menționat că același lucru este valabil și la triptofan, care, într-o mai mică măsură, reduce de asemenea reactivul Folin-Ciocâlteu.

Inițiate de *Herriot* [4], studiile referitoare la punerea în evidență a grupărilor tirozinice mascate din proteine s-au efectuat pe ovalbumină și albumină serică, utilizînd ca denaturant ureea. S-a constatat că, în general, colorația maximă cu reactivul Folin-Ciocâlteu se obține la o concentrație a ureei de 6 M, în unele cazuri deja la 3 M, existînd deci diferențe importante de la o proteină la alta [2]. Considerînd valoarea cromogenă obținută în uree 8 M ca 100%, *Glazer* și *McKenzie* [2] au găsit că reacția directă cu proteina nativă este la ovalbumină de aproximativ 50%, iar la albumină serică bovină de 72,5%.

Și în experiențele noastre, agentul cel mai eficient pentru punerea în evidență a grupărilor fenolice s-a dovedit a fi ureea. Totuși, după părerea noastră, nici cu aceasta nu se ajunge la o demascare totală, ceea ce este confirmat prin încălzirea în prezența NaOH, cînd se obține o extincție și mai mare.

După *Lazdunski* [7], patru resturi tirozinice din molecula de tripsină sînt mascate. Acest mascaj poate fi datorat existenței legăturii de hidrogen. După calcule aproximative bazate pe aceste date și luînd în considerare faptul că reacția de culoare a triptofanului este aproximativ jumătate față de cea a tirozinei, reiese că valoarea cromogenă a tripsinei denaturate prin încălzire în mediu alcalin este cu ceva mai scăzută decît a unei cantități corespunzătoare de tirozină și triptofan în stare liberă.

Diferența se explică prin faptul că tirozina implicată în legături peptidice dă o colorație mai slabă decît cea liberă. Astfel, presupunem că prin denaturarea prin încălzire în mediu alcalin sînt demascate practic toate grupările cromogene ale tirozinei.

Este interesantă acțiunea DSS asupra grupărilor cromogene mascate. Datele din literatura de specialitate dovedesc că acest agent are un efect puternic denaturant. Astfel, în urma acțiunii DSS, viscozitatea albuminelor serice crește considerabil. Pe baza modificărilor rotației optice care se produce sub acțiunea DSS, s-a emis ipoteza că detergentul, desfăcînd interacțiunile dintre catenele laterale alifatice, ar favoriza spiralizarea moleculelor proteice [3], [6], [9].

Scăderea activității enzimatice în urma acțiunii DSS dovedește că denaturarea are loc și în cazul tripsinei. Totuși, sub efectul DSS se produce micșorarea puterii cromogene. Acest fenomen paradoxal ar putea fi explicat prin admiterea unei adsorbții orientate a DSS în jurul catenelor laterale apolare, în urma căreia grupările cromogene și centrul activ ar fi mascate de însuși agentul denaturant.

Nu este însă exclus ca tocmai spiralizarea provocată de DSS să mascheze o parte din grupările fenolice reactive, respectiv centrul activ al tripsinei.

Catedra de biochimie a I.M.F., Tg.-Mureș
și Baza de cercetări științifice Tg.-Mureș
a Academiei Republicii Socialiste România

Prezentată la redacție la 11 iulie 1968

BIBLIOGRAFIE

1. Crammer J. L., Neuberger H., Biochem. J., **37**, 302 (1943).
2. Glazer A. N., McKenzie H. A., Biochim. biophys. Acta, **56**, 526 (1962).
3. Hartshorne D. J., Stracher A., Biochem. Z., **345**, 70 (1966).
4. Herriot R. M., J. gen. Physiol., **19**, 283 (1935).
5. Herriot R. M., J. gen. Physiol., **21**, 501 (1938).
6. Jirgensons B., Arch. Biochem. Biophys., **99**, 348 (1962).
7. Lazdunski M., Biochim. biophys. Acta, **92**, 418 (1964).
8. Loiseleur J., *Techniques de Laboratoire*, Ed. Masson, Paris, 1947, p. 452.
9. Mayer M. L., Kauzmann W, Arch. Biochem. Biophys., **99**, 348 (1962).
10. Russel E. C., Cowgill R. W., Biochim. biophys. Acta **154**, 231 (1968).
11. Sizer J. W., Peacock A. C., J. biol. Chem., **171**, 767 (1947).

BEHAVIOUR OF MASKED PHENOL-GROUPS OF TRYPSIN UNDER THE ACTION OF DENATURING AGENTS

SUMMARY

The behaviour of masked tyrosine phenol groups in trypsin was studied under the denaturing action of heat, urea, sodium dodecylsulphate (SDS), hydrochloric acid and NaOH. Their action upon enzymatic activity was parallelly followed. An increase in the intensity of Folin-Ciocâlteu colour reaction with respect to that of native trypsin was produced by urea (38.2 per cent), hydrochloric acid (26 per cent), NaOH (14.5 per cent) and heat (12.2 per cent). SDS not only does not cause an increase in the amount of phenol groups but even reduces the intensity of the colour reaction.

No parallelism occurs between the action of masked group revelation and that of enzyme activity alteration. Presumably, masked phenol groups do not participate in enzyme activity.

ST. CERC. BIOCHIM., 12, 2, 163—172 (1969)

MODIFICĂRI ÎN ACTIVITATEA ENZIMATICĂ A MUȘCHIULUI PSOAS DE VITĂ PĂSTRAT LA +4°C

DUMITRU MOȚOC și CONSTANTIN BANU

Rezumat. Autorii au urmărit modificările în activitatea ATP-azică, grupările —SH libere, activitatea proteolitică și modificările care au loc în proteinele sarcoplasmatice, precum și evoluția aminoacizilor liberi din mușchiul psoas de vită la păstrarea cărnii la +4°C. Rezultatele obținute arată că activitatea enzimatică a țesutului muscular se menține la un nivel ridicat în timpul depozitării țesutului muscular. Temperatura și timpul de depozitare determină gradul modificărilor enzimatice ale țesutului muscular.

Modificările biochimice care au loc în mușchi, după sacrificarea animalului, sînt extrem de complexe, fiind influențate de o multitudine de factori, ante- și post-mortem [1]—[10]. În literatura de specialitate sînt încă puține date privind activitatea aldolazică a țesutului muscular de vită, porc, oaie. Cercetări mai aprofundate s-au făcut pe mușchiul de pește, păstrat la temperaturi scăzute (—14°C), constatîndu-se diferențe în ceea ce privește activitatea aldolazică a țesutului muscular provenit de la specii diferite. Din datele prezentate în literatură rezultă, de asemenea, că reducerea activității aldolazice a mușchiului de pește, păstrat la —14°C, ar fi consecința denaturării enzimei ca atare sau consecința scăderii progresive a trecerii enzimei în extract [11], [12]. Nu este exclusă nici posibilitatea scăderii activității aldolazei prin oxidarea grupărilor —SH.

Activitatea ATP-azică a țesutului muscular post-mortem este dependentă de temperatura și timpul de păstrare, iar evoluția grupărilor —SH poate caracteriza modificările care intervin în structura unor proteine, în special a celor cu funcții de enzime.

Conținutul de grupări —SH în miozină ar fi de un mol/2 $\cdot 10^5$ g proteină, greutatea moleculară a miozinei, după Kielley și Harrington [13], fiind de 6 $\cdot 10^5$. Se consideră că miozina ar conține două tipuri de grupări —SH. Un tip de grupări —SH ar fi implicat în activitatea ATP-azică, iar cel de-al doilea tip ar participa la combinarea actinei cu miozina. Scăderea activității miozin-ATP-azei din mușchiul congelat, fără o creștere a solubilității proteinelor miofibrilare, arată că, dintre grupările —SH ale miozinei, cele implicate în activitatea ATP-azică sînt în mai mare măsură afectate în timpul păstrării țesutului muscular la temperaturi negative decît cele implicate în formarea actomiozinei [14].

Cercetările efectuate asupra ultrastructurii fibrei musculare au pus în evidență prezența lizozomilor, care conțin catepsine, nucleaze, β-

glucuronidaze, β-galactozidaze etc. Țesutul muscular, spre deosebire de unele organe (ficat, splină), are o activitate enzimatică lizozomială scăzută [15]—[17]. Se consideră că o parte din enzimele lizozomilor sînt legate și pot fi eliberate prin tratarea omogenatelor cu detergentul Triton X—100. Este controversat de asemenea rolul sialopolimerilor din lizozomi în sechestrarea unor enzime [18]—[20].

În țesutul muscular s-au pus în evidență trei grupe de catepsine: catepsine cu pH optim 3,8—5,0, a căror activitate este inhibată la pH 5 de EDTA și stimulată de Fe^{2+}; catepsine cu pH optim 9, activate de EDTA și inhibate de Fe^{2+} [21]; catepsine incluzînd enzime similare cu leucin-aminopeptidaza pancreatică și carboxipeptidaza [22]—[25]. Dintre catepsinele țesutului muscular au fost studiate mai bine catepsina A [21] și catepsinele B și C [26].

Trebuie arătat că transformările biochimice care au loc în mușchi post-mortem creează condiții optime pentru eliberarea și activitatea catepsinelor. Locker [27] arată că la pH 5,5 stabilitatea membranei lizozomului este redusă, iar după Lawrie [28], proteinele sarcoplasmatice „denaturate" din cauza acidității devin mai susceptibile atacului catepsinelor. S-a găsit că activitatea proteolitică a mușchiului întreg este maximă după 48 de ore post-mortem [29], [30].

Scopul lucrării de față a fost acela de a aduce noi clarificări în problema biochimiei țesutului muscular păstrat în condiții de refrigerare, în vederea stabilirii timpului optim de maturare a cărnii cu caracteristici organoleptice clar exprimate.

MATERIAL ȘI METODĂ

Ca material de lucru s-a utilizat mușchiul psoas de vită, recoltat de la animale cu îngrășare medie, sacrificate în condiții de abator. Probele s-au păstrat apoi la $+4°C \pm 1°$, ambalate sub vid în pungi de polietilenă, după o prealabilă stropire cu aureociclină 10 p.p.m.

a) Determinarea activității aldolazice

Pregătirea omogenatului. 30 g țesut muscular, recoltat din partea centrală a mușchiului și apoi mărunțit grosier, s-au omogenizat timp de 75 s într-un omogenizator Atomix, cu 300 ml apă distilată, răcită la 2°C. Omogenatul s-a diluat cu 15 volume de apă distilată răcită la 2°C și s-a menținut 2 ore la 0°C, înainte de determinarea activității enzimatice. Pentru determinarea activității enzimatice a extractului, omogenatul pregătit ca mai sus s-a centrifugat 10 min la 6 000 rot/min, extractul obținut fiind menținut la 0°C pînă la utilizare.

Activitatea aldolazică a omogenatului și extractului s-a determinat după metoda lui Bruns și Bergmeyer [31]. Pentru omogenat, activitatea aldolazică s-a exprimat în μM fructozo-1,6 — difosfat/g țesut/30 min, iar pentru extract și în μM fructozo-1,6-difosfat/g proteine/30 min.

b) Determinarea activității ATP-azice

Activitatea ATP-azică a țesutului muscular s-a determinat pe complexul actomiozinic (miozină B), obținut prin extragere cu soluție Weber-Edsall [32].

Obținerea complexului actomiozinic. Țesutul muscular mărunțit, curățat de grăsime și țesut conjunctiv, s-a extras cu 3 volume de soluție Weber-Edsall răcită. Suspensia s-a lăsat în repaus 24 de ore la 3°C, după care s-a centrifugat. Actomiozina s-a separat de proteinele solubile prin scăderea puterii ionice a soluției. Diluarea s-a făcut cu soluție tampon de fosfați cu pH 6,5 și putere ionică 0,05. După centrifugare la 6 000 rot/min, precipitatul obținut s-a resolubilizat în soluție de KCl 0,6 M. După o nouă precipitare, actomiozina s-a resolubilizat în soluție de KCl 0,6 M, concentrația proteinei în soluție fiind de circa 1,5%. Evaluarea cantitativă a proteinei în soluție s-a făcut prin metoda Kjeldahl.

Activitatea enzimatică s-a măsurat prin determinarea cantității de ortofosfat, după Martin și Doty [33].

c) Determinarea grupărilor — SH libere

Obținerea filtratului. 5 g țesut muscular s-au omogenizat cu 3 g NaCl și 10 ml HPO_3 2,25%. Omogenatul s-a adus la 20 ml cu HPO_3 2,25% și s-a lăsat în repaus 10 min. Toate operațiile s-au executat la rece și sub atmosferă de azot. Omogenatul s-a centrifugat 5 min la 3 000 rot/min și s-a filtrat, iar din filtrat s-au folosit 4 ml pentru reacția de culoare.

Grupările —SH libere s-au determinat după Coleby ș.a. [34].

d) Determinarea activității proteolitice a mușchiului

Pregătirea extractului. 200 g țesut muscular, curățat de grăsime și țesut conjunctiv, s-au omogenizat cu 400 ml apă distilată deionizată și răcită. Omogenizarea s-a făcut timp de 90 s la 3 000 rot/min într-o morișcă de laborator și la 17 000 rot/min într-o morișcă tip Broyeur mixer B. 17.

Porțiuni de omogenat s-au autolizat 1 oră la 22°C și 16 ore la 4°C, după care s-au centrifugat 5 min la 6 000 rot/min. Extractul obținut s-a folosit ca sursă de enzime, fie ca atare, fie după o dializă de 24 de ore față de apă deionizată. Dializa s-a efectuat la +2°C.

Pregătirea substratului. Pentru pregătirea substratului s-a utilizat hemoglobină pură Schuchardt München, din care s-a pregătit o soluție de rezervă 10%. Aceasta s-a dializat 12 ore față de apă de canal și apoi 8 ore față de apă deionizată. Din soluția de rezervă s-a pregătit substratul de hemoglobină (2% Hb și 3M uree în tampon acetat de sodiu — HCl, pH 4,4). S-a utilizat și substratul de hemoglobină nedializată.

Activitatea proteolitică s-a determinat după Silwinski [35]. Se cunoaște că maximul de absorbție al tirozinei și triptofanului este la 2800 Å [36], iar maximul de absorbție al tirozinei pure, la pH 6, este la 2745 Å [37]. Întrucît atît tirozina, cît și produșii solubili în acid tricloracetic, rezultați în urma digestiei, au arătat același maxim de absorbție la 2760 Å, rezultatele s-au exprimat în micrograme tirozină, utilizîndu-se în acest sens o curbă etalon.

e) Proteinele din sarcoplasmă

Acestea s-au extras conform procedurii lui Teschi și colab. [38], separarea lor făcîndu-se prin electroforeză pe hîrtie. Evaluarea cantitativă a fracțiunilor proteice s-a realizat prin eluarea spoturilor cu NaOH 0,1 N și prin măsurarea densității optice la 660 mμ. S-a calculat procentual fiecare fracțiune, ținînd seama de valoarea totală a densităților optice. Pentru obținerea valorii absolute a diferitelor fracțiuni proteice s-a ținut seama de cantitatea totală de proteine din extract, determinată prin metoda Kjeldahl.

f) Aminoacizii liberi

Aminoacizii din țesutul muscular s-au separat prin cromatografie pe hîrtie. Pregătirea extractului s-a făcut după Awapara și Sato [39]. Hîrtia cromatografică s-a pregătit după Thompson și colab. [40], [41]. Developarea cromatogramelor, conservarea și eluția s-au făcut după Bode [42]. Densitatea optică s-a măsurat la 504 mμ. S-au executat curbe etalon pentru fiecare aminoacid.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

După cum se poate vedea din rezultatele înscrise în tabela 1, activitatea aldolazică a extractului este asemănătoare cu cea a omogenatului, de unde se deduce că enzima, care în mod normal este solubilă în apă, nu se atașează la alte proteine ale țesutului muscular. Activitatea aldolazică cea mai ridicată s-a constatat pentru mușchiul aflat în faza de prerigor. Începînd cu 24 de ore după sacrificarea animalului, s-a înregistrat o ușoară creștere a activității aldolazice a țesutului muscular pe toată perioada depozitării la +4°C (tabela 1). Această creștere pare paradoxală dacă ținem cont că pe toată perioada depozitării mușchiului noi am înregistrat

Tabela 1

Evoluția activității aldolazice, a numărului de grupări – SH și a activității ATP- azice din mușchiul psoas de vită*

	Timp de păstrare la +4°C (ore)					
	3	24	48	72	96	120
Activitatea aldolazică a omogenatului (μM fructozo-1,6-difosfat/g țesut/30 min)	75,0	62,5	65,0	67,5	70,0	72,5
Activitatea aldolazică a extractului (μM fructozo-1,6-difosfat/g țesut/30 min)	72,5	61,2	62,6	70,2	72,5	72,8
Activitatea aldolazică a extractului (μM fructozo-1,6-difosfat/g proteine solubile/ 30 min)	1 895	1 180	1 430	1 719	2 210	2 330
	3	48	96	144	192	264
Grupări – SH (μg GSH/g țesut)	273	253	253	243	237	237
Activitatea ATP-azică (μgP/g proteină/min)	148	140	130	82	57	56

* Rezultatele exprimă media a trei carcase, pentru fiecare efectuîndu-se determinări în duplicat

o scădere progresivă a solubilității proteinelor sarcoplasmatice în totalitatea lor. Această micșorare a solubilității poate fi pusă pe seama interacțiunii dintre proteinele sarcoplasmatice și substanțele neproteice sau pe seama denaturării și agregării proteinelor solubile, procese influențate de pH [43], [44].

De remarcat că diferitele proteine sarcoplasmatice se comportă diferit la păstrarea mușchiului în condiții de refrigerare. Supunînd analizei electroforetice extractul obținut cu tampon fosfat de pH 7,4, $\mu = 0{,}15$,

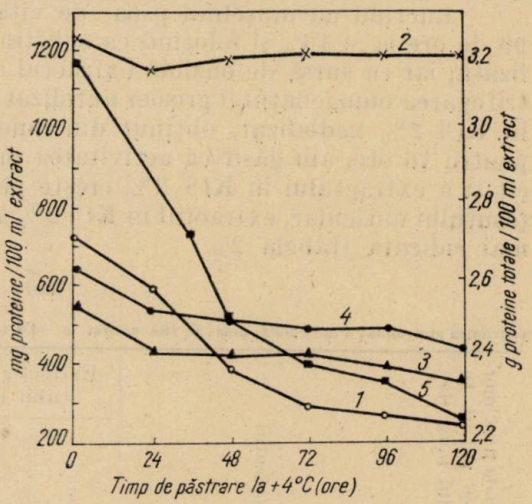


Fig. 1. — Variația solubilității diferitelor fracțiuni de proteine sarcoplasmatice separate prin electroforeză pe hîrtie.

1 – proteine cu mobilitate electroforetică mică; *2* – proteinele grupului miogen + mioglobină; *3* – globulina X; *4* – mioalbumina; *5* – proteine totale.

am constatat că proteinele grupului miogen, din care face parte și aldolaza, sînt mai puțin afectate în cursul depozitării țesutului muscular la +4°C, valorile găsite pentru diferite perioade post-mortem menținîndu-se aproape constante. În comparație cu proteinele grupului miogen, după 120 de ore de păstrare a mușchiului la +4°C, mioalbumina și globulina X au reprezentat în extract numai 68,1 și ,respectiv, 64,2% din valorile lor inițiale, considerate 100% (fig. 1).

Rezultă că proteinele grupului miogen își păstrează bine proprietatea de solubilitate chiar într-un interval mare de depozitare a țesutului muscular și că, prin urmare, activitatea aldolazică ridicată, constatată de noi, se explică tocmai prin stabilitatea aldolazei în condițiile de pH realizate în mușchiul post-mortem, deși paralel s-a înregistrat o micșorare lentă a numărului de grupări —SH libere (tabela 1).

Micșorarea numărului de grupări —SH libere este legată în special de modificările care au loc în configurația proteinelor, mai ales a celor miofibrilare. Cea mai însemnată micșorare a numărului de grupări —SH s-a constatat pentru perioada 3—48 de ore post-mortem, ceea ce este explicabil dacă ținem seamă că în faza de rigor se formează complexul actomiozinic.

Datele găsite de noi privitoare la caracterizarea activității ATP-azice denotă că există un paralelism strîns între evoluția grupărilor —SH și activitatea ATP-azică a proteinelor miofibrilare. De remarcat că în intervalul 3—48 de ore post-mortem activitatea ATP-azică nu este atît de sever afectată ca în intervalul 48—264 de ore post-mortem. Această

comportare ar sugera că în cursul depozitării țesutului muscular la +4°C, pentru o perioadă mai îndelungată, ar avea loc o modificare a interacțiunii dintre actină și miozină [45]—[48], deci o schimbare a raportului dintre actina și miozina din complexul actomiozinic.

În urmărirea activității proteolitice a mușchiului s-a luat în considerație influența următorilor factori: mediul de extracție, gradul de omogenizare a țesutului (grosieră sau fină), gradul de autoliză a omogenatului, calitatea substratului și a extractului (dializate sau nedializate).

Lucrînd cu mușchiul psoas de vită, păstrat pentru o perioadă de 96 de ore la +4°C, și folosind ca substrat hemoglobină denaturată nedializată, iar ca sursă de enzimă extractul apos nedializat, obținut prin centrifugarea omogenatului grosier autolizat o oră la 22°C, precum și extractul în KCl 2% nedializat, obținut din omogenat grosier autolizat la +4°C pentru 16 ore, am găsit că activitatea proteolitică atît a extractului apos, cît și a extractului în KCl 2% crește pe toată perioada de depozitare a țesutului muscular, extractul în KCl 2% avînd însă o activitate proteolitică mai ridicată (tabela 2).

Tabela 2

Activitatea proteolitică a mușchiului psoas de vită păstrat la +4°C (omogenizare grosieră, substrat și extract nedializat *)

Perioada post-mortem și pH-ul țesutului muscular	Tratamentul	Extincția supernatantului la 276 mμ			Tirozină eliberată (μg)	Activitatea specifică (μgp tirozină /μgN și 4 ore)	Creșterea procentuală a activității proteolitice față de inițial
		probă	martor	diferență			
Inițial 6,60	a. extract apos	1,035	0,970	0,065	112	32,30	100,0
	b. extract KCl 2%	1,025	0,950	0,075	128	38,40	100,0
24 de ore 5,85	a. extract apos	1,130	1,060	0,070	120	36,10	117,7
	b. extract KCl 2%	1,075	1,00	0,075	128	48,40	126,0
48 de ore 5,92	a. extract apos	1,070	1,010	0,080	136	37,60	116,4
	b. extract KCl 2%	1,150	1,043	0,107	197	58,50	158
72 de ore 5,96	a. extract apos	1,125	1,030	0,095	167	45,20	140,0
	b. extract KCl 2%	1,137	1,015	0,122	220	67,96	177,0
96 de ore 6,0	a. extract apos	1,150	1,050	0,100	184	69,60	170,2
	b. extract KCl 2%	1,040	0,850	0,190	360	72,00	187,4

* Rezultatele exprimă media a trei carcase, pentru fiecare carcasă efectuîndu-se determinări în duplicat.
a. Omogenatul s-a autolizat 1 oră la 22°C
b. Omogenatul s-a autolizat 16 ore la +4°C

Folosind extractele apoase și în KCl 2% dializate, obținute din omogenate fine, autolizate, la +4°C timp de 16 ore, iar ca substrat hemoglobină denaturată dializată, am constatat că activitatea specifică proteolitică este evident mai ridicată, iar creșterea procentuală de la o perioadă post-mortem la altă perioadă post-mortem este sporită sensibil (tabela 3).

Tabela 3

Activitatea proteolitică a mușchiului psoas de vită păstrat la 4°C (omogenizare fină, substrat și extract dializat)*

Perioada post-mortem și pH-ul cărnii	Tratamentul	Extincția supernatantului la 276 mμ			Tirozină eliberată (μg)	Activitatea specifică (μg tirozină/μg N și 4 ore)	Creșterea procentuală a activității proteolitice față de inițial
		proba	martor	diferență			
Inițial 6,60	a. extract apos	0,670	0,585	0,085	152	59,3	100
	extract KCl 2%	0,710	0,585	0,125	232	69,8	100
24 de ore 5,85	a. extract apos	0,660	0,580	0,080	136	73,4	123,6
	extract KCl 2%	0,710	0,575	0,135	256	100	143,2
48 de ore 5,92	a. extract apos	0,700	0,620	0,080	136	77,7	131,0
	extract KCl 2%	0,750	0,595	0,155	288	112,5	161,1
72 de ore 5,96	a. extract apos	0,720	0,605	0,115	208	87,2	147,0
	extract KCl 2%	0,770	0,610	0,160	336	128,9	187
96 de ore 6,0	a. extract apos	0,775	0,625	0,150	270	103,8	175,0
	extract KCl 2%	0,818	0,630	0,188	358	138,2	198

* Rezultatele exprimă media a trei carcase, pentru fiecare carcasă efectuîndu-se determinări în duplicat.
a. Omogenatul s-a păstrat 16 ore la 4°C.

În primele 24 de ore de depozitare la +4°C, creșterea activității proteolitice este mai mică decît în perioadele următoare. S-a obținut un maxim de activitate proteolitică la 96 de ore post-mortem.

Nu s-a constatat un paralelism între creșterea activității proteolitice a mușchiului și variațiile de pH ale acestuia. Deși este cunoscut faptul că o serie de catepsine au pH-ul optim la 5—5,4, creșterea activității proteolitice a mușchiului cu valori pH mai ridicate față de cele menționate s-ar putea pune pe seama modificărilor care intervin în calitatea substratului (modificarea proteinelor sarcoplasmatice, datorită acidității post-mortem) sau pe seama activității inițiale a catepsinelor asupra sub-

stratului. Este posibilă chiar o activare a însești catepsinelor, ca rezultat al interacțiunii lor, în primele stadii, cu produșii de autoliză de natură neproteică, conducînd la creșterea activității fermentative a celor dintîi [43].

Evoluția aminoacizilor liberi este în concordanță cu datele găsite pentru activitatea proteolitică a mușchiului. Am putea conchide că între creșterea acestei activități și cea a cantității totale de aminoacizi liberi există un paralelism, care se menține pe toată perioada de depozitare. Acumulările sporite de aminoacizi liberi au loc după 24 de ore post-mortem, cînd și activitatea proteolitică a mușchiului este mai mare în comparație cu cea inițială.

Creșteri spectaculoase s-au înregistrat pentru lizină + histidină, arginină, serină + acid aspartic, glicină, alanină și fenilalanină (tabela 4).

Tabela 4

Variația conținutului de aminoacizi liberi în mușchiul psoas de vită păstrat la +4°C*

Nr. crt.	Aminoacizi	Timp de păstrare la + 4°C (ore) mg aminoacid/100 g țesut					
		Inițial	48	96	144	192	264
1	Lizină (+ histidină)	2,72	3,04	5,85	9,24	11,00	13,24
2	Arginină	1,30	1,69	2,30	4,00	5,74	7,00
3	Serină (+ acid aspartic)	13,00	15,00	16,00	35,00	35,48	40,00
4	Glicină	3,00	3,74	5,00	10,00	12,24	16,00
5	Acid glutamic	11,00	15,00	21,16	19,50	21,30	24,36
6	Treonină	1,80	1,96	2,44	4,24	4,38	6,72
7	Alanină	15,50	22,71	23,24	35,00	55,16	62,50
8	Tirozină (+ alanină)	3,96	4,25	5,65	5,80	6,72	7,27
9	Valină	2,15	2,37	2,70	3,75	4,50	5,75
10	Fenil-alanină	5,20	5,32	7,50	10,00	16,10	17,50
11	Leucină (+ izoleucină)	2,90	3,90	4,21	4,54	5,00	6,24
	Total	62,54	80,18	96,34	111,07	177,62	206,54

* Rezultatele exprimă media a trei carcase, pentru fiecare carcasă efectuîndu-se determinări în duplicat.

CONCLUZII

În mușchiul post-mortem, activitatea enzimatică a unor proteine este influențată în mod deosebit de temperatura de păstrare și de timpul de depozitare. În timp ce activitatea aldolazică a țesutului muscular nu este modificată sensibil, activitatea ATP-azică scade simțitor, paralel

cu aceasta înregistrîndu-se și o scădere a numărului de grupări — SH libere.

Activitatea proteolitică a țesutului muscular în faza de postrigor este evident superioară față de aceea din fazele de prerigor și rigor, ceea ce demonstrează eliberarea catepsinelor din lizozomi. Trecerea enzimelor proteolitice în extract depinde de mediul de extracție, de gradul de omogenizare a țesutului muscular și de timpul de autoliză a extractului. Acumulările masive de aminoacizi liberi corespund stadiului de activitate proteolitică maximă a țesutului muscular.

Prezentată la redacție la 10 aprilie 1968

Facultatea de tehnologia produselor alimentare, Galați

BIBLIOGRAFIE

1. R. N. Sayre, E. J. Briskey, J. Food Sci., **28**, 675 (1963).
2. J. L. Hall, L. Harrison, D. Westerman, L. Anderson, D. L. Mackintosh, Kansas. Expt. Sta. Techn. Bull., 119 (1961).
3. E. J. Briskey, R. W. Bray, W. Hoekstra, R. H. Grummer, P. H. Phillips, J. Animal Sci., **18**, 153 (1959).
4. E. J. Briskey, R. W. Bray, W. Hoekstra, R. H. Grummer, P. H. Phillips, J. Animal Sci., **19**, 404 (1960).
5. J. Ludwigsen., Acta endocrin., **26**, 406 (1957).
6. J. Wismer-Pedersen, E. J. Briskey, Nature, Lond., **189**, 318 (1961).
7. W. Partmann, J. Food Sci., **28**, 15 (1963).
8. R. N. Sayre, E. J. Briskey, W. G. Hoekstra, J. Food Sci., **28**, 292 (1963).
9. W. Sybesma, J. C. M. Heer, IXth European Meat Research Conference, Budapest, Hungary, 1963.
10. A. A. Sokolov, Mohamed Ili Daslutî, Pișcevaia Tehnologhia, *4*, 86 (1963).
11. J. J. Connell, J. Food Sci., **31**, 313 (1966).
12. J. J. Connell, J. Sci. Food Agr., **11**, 245 (1960).
13. W. W. Kielley, W. F. Harrington, Biochim. biophys. Acta, **41**, 401 (1960).
14. A. V. Khan, L. van den Berg, C. P. Lent, J. Food Sci., **28**, 425 (1963).
15. H. Zalkin, A. L. Tappel, K. A. Caldwell, S. Shibko, I. D. Desai, T. A. Holiday, J. biol. Chem., **237**, 2678 (1962).
16. A. L. Tappel, H. Zalkin, K. A. Caldwell, I. D. Desai, S. Shibko, Arch. Biochem. Biophys, **96**, 340 (1962).
17. S. Shilko, K. A. Caldwell, P. L. Sawant, A. L. Tappel, J. cell. comp. Physiol., **61**, 85 (1963).
18. E. J. Briskey, et al. (sub red.), *The Physiology and Biochemistry of Muscle as a Food*, The University of Wisconsin Press, Madison (Milwaukee) și Londra, 1966.
19. A. L. Tappel, S. Shibko, M. Stein, J. P. Susz, J. Food Sci., **30**, 498 (1965).
20. H. Koenig, Nature, Lond., **195**, 782 (1962).
21. W. A. Landmann, Proceedings Meat Tenderness Symposium, Campbell Soup Co., 1963.
22. I. A. Smorodințev, N. V. Nikolaeva, DAN SSSR, Novaia Seria, 1 2 (1936).
23. G. Green, Acta physiol., scand., **8**, 369 (1944).
24. T. B. Schwartz, J. biol. Chem., **204**, *1*, 61 (1953).
25. E. L. Smith, J. biol. Chem., **172**, *2*, 57 (1949).
26. C. E. Bodwell, A. M. Pearson, J. Food Sci., **29**, 602 (1964).
27. R. H. Locker, J. Sci. Food Agr., **11**, 250 (1960).
28. R. A. Lawrie, *Recent Advances in Food Science*, vol. I, John Hawthorn, Londra, 1962, p. 63.
29. P. E. Pavlovschi, Miasnaia Industria, **1**, 50 (1965).
30. P. E. Pavjovschi, G. P. Golovkina, Pișcevaia Tehnologhia, *2*, 31 (1964).
31. F. H. Bruns, H. H. Bergmeyer, *Methods of Enzimatic Analysis*, Verlag Chemie Weinheim and Academic Press, New York, 1963.
32. E. Mihaly, A. J. Rowe, Biochem. Z., **345**, 267 (1966).

33. J. R. Martin, M. D. Doty, *Methods of Biochemical Analysis*, vol. 3, Interscience Publishers, New York, 1949.
34. B. Coleby, M. Ingram, H. N. Sephard, M. J. Thornley, G. M. Wilson, J. Sci. Food Agr., **12**, 483 (1956).
35. R. A. Silwinski, D. M. Doty, W. A. Landmann, J. Agr. Food Chem., **7**, *11*, 788 (1959).
36. E. R. Holiday, Biochem. J., **30**, *17*, 95 (1936).
37. D. B. Wetlaufer, J. T. Edsall, B. R. Hollingworth, J. biol. Chem., **233**, 1421 (1958).
38. G. Teschi, G. B. Marini Bettolo, Biochim. biophys. Acta, **21**, 531 (1956).
39. I. Awapara, I. Sato, Clin. Acta, **1**, 73 (1966).
40. J. F. Thompson, R. M. Zacharius, F. C. Steward, Plant Physiol., **26**, 375 (1951).
41. J. F. Thompson, F. C. Steward, Plant Physiol., **26**, 421 (1956).
42. F. Bode, Biochem. Z., **326**, 433 (1955).
43. P. E. Pavlovschi, M. P. Grigorieva, Pişcevaia Tehnologhia, **32**, 24 (1963).
44. J. J. Connell, J. Biochem., **75**, 530 (1960).
45. M. Fujimaki, N. Arakawa, A. Okitani, O. Takagi, J. Food Sci., **30**, 937 (1965).
46. M. Fujimaki, A. Okitani, N. Arakawa, Agr. Biol. Chem., **29**, 581 (1965).
47. F. J. King, J. Food Sci., **31**, 649 (1966).
48. P. L. Sawant, N. G. Magar, J. Food Sci., **26**, 253 (1961).

CHANGES IN ENZYME ACTIVITY OF BEEF PSOAS MUSCLE STORED AT +4 °C

SUMMARY

The authors studied the changes in ATP-ase activity, free-SH groups, proteolytic activity, sarcoplasmatic proteins, and the evolution of free aminoacids in beef Psoas muscle after storage of meat at +4°C. The data obtained showed that enzymatic activity of the muscle tissue after slaughter is maintained at a high level during storage. The temperature and time of storage determine the extent of the changes in the whole enzymatic activity of muscle tissue.

St. CERC. BIOCHIM., 12, 2 173–179 (1969)

BIOCHIMIA COMPARATĂ A IZOENZIMELOR. IV. IZOENZIMELE LACTICODEHIDROGENAZEI DIN MUȘCHII SCHELETICI ÎN SERIA VERTEBRATELOR*

MIHAIL ȘERBAN și DITA COTARIU

Rezumat. S-a evidențiat polimorfismul izoenzimelor lacticodehidrogenazei (LD) din mușchii scheletici în seria vertebratelor. Modelul izoenzimatic LD prezintă, în funcție de specie, o serie de particularități, care interesează gradul de eterogenitate, mobilitatea electroforetică și raporturile cantitative dintre fracțiuni. Activitatea enzimatică LD este mai crescută în mușchiul de mamifer decît la celelalte specii de vertebrate. Se discută trăsăturile comune și deosebirile specifice dintre izoenzimele LD musculare și cele din creier, în filogenia vertebratelor.

În cercetări anterioare de biochimie comparată, am pus în evidență relațiile de unitate și diversitate, respectiv de continuitate și discontinuitate a proteinelor solubile din creier, ca expresie a evoluției filogenetice [1]. Studiul unor izoenzime cerebrale și musculare, pe care l-am abordat recent [2]–[4], reprezintă o continuare a acestor cercetări de biochimie comparată, ca un caz particular al filogeniei proteinelor. În aceste ultime lucrări am stabilit că izoenzimele lacticodehidrogenazei și aldolazei din creier și mușchi au suferit un proces de evoluție moleculară și am precizat corelațiile dintre polimorfismul lor și raporturile filogenetice dintre specii de vertebrate ce ocupă poziții taxonomice diferite. După cum am arătat anterior, considerăm că studiul comparativ al formelor enzimatice molecular-multiple poate contribui la precizarea relațiilor mutuale dintre evoluția moleculară și cea biologică [5], [6].

Prezenta lucrare are ca scop caracterizarea izoenzimelor lacticodehidrogenazei (LD) din mușchii scheletici ai unor specii de verebrate [7], [8], situate pe diferite trepte de evoluție. Intenția lucrării este, așadar, să stabilească trăsăturile comune și particularitățile specifice ale izoenzimelor LD ca reflectare a evoluției, respectiv integrarea lor în acest proces evolutiv.

MATERIAL ȘI METODĂ

S-a lucrat pe mușchi scheletic provenind de la 11 specii situate pe diferite trepte de evoluție, reprezentînd toate cele cinci clase de vertebrate și, în limita posibilităților, în interiorul aceleiași clase ordine sau

* Asistența tehnică T. Bența.

familii diferite : peşti (crap, caras), amfibii (urodele — triton, anure — broască), reptile (chelonieni — broască ţestoasă, ofidieni — şarpe), păsări (porumbel, găină) şi mamifere (şobolan, iepure, bou). Determinările s-au efectuat în general pe muşchii gastrocnemieni şi în unele cazuri (peşte, triton şi şarpe) pe muşchii scheletici dorsali. Muşchii respectivi, prelevaţi imediat după sacrificare (de la 2—6 indivizi, după caz), au fost spălaţi de repetate ori cu soluţie fiziologică rece, tamponaţi cu hîrtie de filtru şi cîntăriţi. În paralel s-a utilizat şi procedeul „fixării" ţesutului muscular prin îngheţare în azot lichid. Rezultatele au fost identice în ambele variante.

Extracţia proteinelor sarcoplasmatice s-a efectuat timp de 2 ore la + 4°C, în tampon Tris-HCl 2 · 10^{-2} M, pH 7,6. Raportul de extracţie a fost o parte greutate ţesut şi trei părţi soluţie extractant. Omogenatele obţinute la rece au fost ulterior centrifugate 20 min la 5 000 g (+4°C), iar supernatantul respectiv a fost recentrifugat 40 min la 22 000 g (+4°C). Concentraţia proteică a extractelor a variat între 1,9 şi 2,2 g/100 ml, în funcţie de provenienţa ţesutului muscular.

Electroforeza proteinelor musculare sarcoplasmatice s-a efectuat în gel de amidon, în tampon discontinuu, după varianta Poulik [9]. Gelul s-a obţinut cu o soluţie 12,8% amidon în tampon Tris-acid citric, pH 8,6. Condiţiile de fracţionare electroforetică au fost următoarele : tensiune 16 V/cm, intensitate 2,6 mA/cm, durata 150 min la +10°C. S-au aplicat probe de cîte 20 µl. Fracţiunile proteice au fost revelate cu o soluţie de amidoblack B, după secţionarea prealabilă a gelului.

Evidenţierea izoenzimelor LD s-a realizat prin procedeul imersiei, după tehnicile utilizate în lucrări anterioare [10]—[11]. S-a folosit ca substrat lactatul de sodiu, ca sare de tetrazoliu TNBT, iar ca acceptori intermediari NAD şi fenazinmethosulfat. Aprecierea cantitativă a rezultatelor s-a făcut prin prelucrarea datelor obţinute din curbele de integrare.

Activitatea enzimatică totală a LD din muşchi a fost determinată spectrofotometric, urmărindu-se oxidarea NADH în prezenţa piruvatului la 340 mµ. Pentru dozarea activităţii enzimatice, concentraţia soluţiei de proteine musculare sarcoplasmatice a fost ajustată la o valoare convenabilă, prin diluare în raportul 1/20—1/60, în funcţie de provenienţa probei. Activitatea enzimatică a fost exprimată în unităţi Wroblewski [12] şi raportată la 1 mg proteină.

Reactivi. Amidon hidrolizat BDH, tetranitrobluetetrazolium şi fenazinmethosulfat Serva, NAD şi NADH Merck. Toţi ceilalţi reactivi au fost p.a.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Izoenzimele LD din muşchii scheletici ai speciilor de vertebrate investigate se caracterizează printr-o serie de particularităţi care interesează gradul de eterogenitate, mobilitatea electroforetică, raporturile activităţii enzimatice localizate pe diferite fracţiuni; LD prezintă, de asemenea, variaţii ale valorilor activităţii totale. Diferenţele evidenţiate la nivelul acestor indici sînt în funcţie de specie, respectiv de poziţia taxonomică pe care aceasta o ocupă în scara filogenetică.

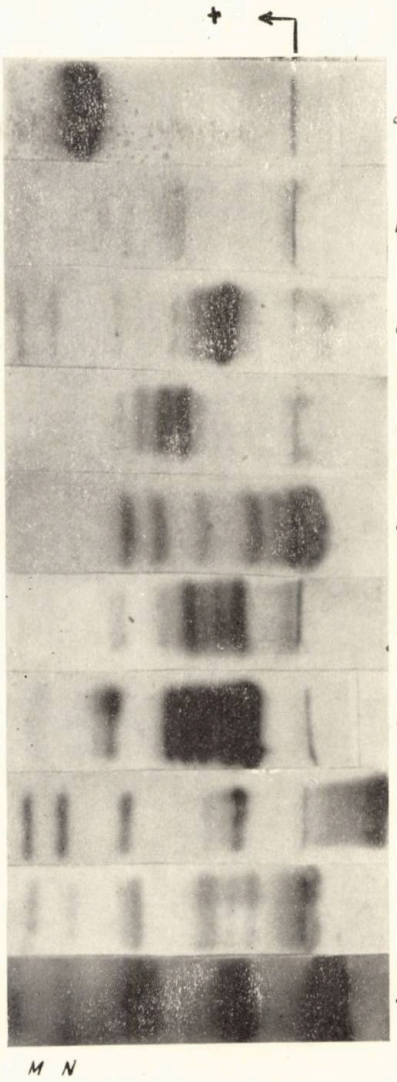


Fig. 1 — Modelul izoenzimelor lacticodehidrogenazei din mușchii diferitelor vertebrate.

a — pește; *b* — triton; *c* — broască; *d* — broască țestoasă; *e* — șarpe; *f* — găină; *g* — porumbel; *h* — șobolan; *i* — iepure; *j* — bou.

Astfel, din figura 1, în care sînt prezentate modelele izoenzimatice LD din mușchii scheletici la diferite vertebrate, rezultă că polimorfismul acestor izoenzime este mai accentuat la vertebratele superioare (păsări și mamifere). Gradul de eterogenitate al izoenzimelor LD apare net diferit la cele două clase extreme — pești și mamifere. Într-adevăr, la mușchiul de pește se constată prezența unei fracțiuni majore, cu tendința de individualizare a unei subfracțiuni, pe cînd la mușchii de mamifere se evidențiază toate cele cinci tipuri principale de izoenzime LD, la care se adaugă, în unele cazuri, și alte subfracțiuni. O eterogenitate oarecum similară prezintă și izoenzimele LD din mușchiul scheletic de pasăre, în special de porumbel (fig. 1, *g*); la această clasă însă, repartiția izoenzimelor este total diferită în comparație cu mamiferele. La celelalte specii de vertebrate, izoenzimele LD din mușchi manifestă grade de eterogenitate intermediare cu excepția mușchiului de broască (fig. 1, *c*), unde se pun în evidență șapte fracțiuni, avînd însă în majoritate o activitate foarte redusă.

Datele obținute relevă existența unor forme moleculare multiple ale LD din musculatura scheletică în seria vertebratelor. Totuși, deși acestea catalizează de fapt același tip de reacție, ele manifestă deosebiri semnificative ale mobilităților lor electroforetice.

Repartiția izoenzimelor LD din mușchii scheletici, în funcție de mobilitatea electroforetică oglindește, de fapt, o specificitate de specie. Sub acest aspect, aproape fiecare specie prezintă anumite particularități distincte ale modelului izoenzimatic. Astfel, la mamifere izoenzimele LD se caracterizează prin două tipuri (M și N) cu mobilitate electroforetică mai mare decît la celelalte specii de vertebrate. O excepție o constituie mușchiul de broască, la care se constată, de asemenea, prezența celor două fracțiuni frontale cu migrare rapidă. Izoenzimele LD din mușchiul de pește, deși manifestă cel mai mic grad de eterogenitate, se caracterizează totuși printr-o mare mobilitate în cîmpul electric. Totodată, se poate considera că izoenzimele LD din mușchiul de mamifere sînt repartizate pe un front mai larg în comparație cu celelalte vertebrate. Izoenzimele LD din mușchii de pasăre (fig. 1, *f*, *g*) migrează într-un front mai compact, diferitele tipuri de izoenzime posedînd mobilități electroforetice foarte apropiate între ele; o comportare similară manifestă și izoenzimele LD din mușchii de broască țestoasă, triton și pește, specii care aparțin la clase diferite de vertebrate. În schimb, la mușchiul de șarpe, aceste izoenzime sînt etalate într-un spectru mai larg decît cel al speciilor de vertebrate inferioare menționate anterior. În fine, o mențiune aparte necesită mușchii unor mamifere (șobolan) și reptile (șarpe), la care se evidențiază prezența izoenzimei de tip „A" cu migrare catodică (fig. 1, *e*, *h*).

Considerațiile de mai sus, referitoare la deosebirile de mobilitate în cîmp electric a izoenzimelor LD din mușchi, ilustrează, pe de altă parte, dificultatea precizării apartenenței, respectiv a stabilirii nomenclaturii diferitelor tipuri de izoenzime. Într-adevăr, la speciile de vertebrate mai puțin evoluate decît mamiferele nu se poate stabili o deplină corespondență de poziție cu cele cinci tipuri principale de izoenzime LD cunoscute în mușchiul scheletic de mamifer [13]—[18]. După părerea noastră, dacă se ia ca sistem de referință acest model izoenzimatic clasic, apartenența diferitelor izoenzime din mușchii celorlalte specii de vertebrate se poate preciza luîndu-se ca criteriu fie corespondența de mobilitate cu

fracţiunile cele mai lente din muşchii de mamifer, fie mobilitatea electroforetică ca atare, ordonîndu-le după această valoare [3].

Prima alternativă este redată în tabela 1, unde apartenenţa, respec-

Tabela 1

Repartiţia izoenzimelor LD din muşchii scheletici ai vertebratelor în funcţie de mobilitatea electroforetică şi valorile procentuale ale activităţilor diferitelor tipuri de izoenzime

(cifrele reprezintă media a trei determinări)

Clase / Specii	Tipuri de izoenzime LD — Subfracţiuni: LD_1	LD_2		LD_3		LD_4					LD_5	
Peşti												
crap												
caras		22	78									
Amfibii												
triton				14	28	20	38					
broască	6	11		4		8	5	66				
Reptile												
broască ţestoasă				16		22	52	10				
şarpe				12	11	8	14				8	47
Păsări												
porumbel		4		12		10	12	18	14	30		
găină			2	3	3	27	12	53				
Mamifere												
şobolan	8	14		12		4	17	8				37
iepure	6	4		16		9	3	5			6	51
bou	8	10		24		6	22					30

tiv repartizarea diferitelor izoenzime LD în spectrul electroforetic, la fiecare specie este prezentată prin cifre, care indică totodată şi valoarea procentuală relativă a fiecărei fracţiuni. Din această tabelă rezultă că, după criteriul corespondenţei mobilităţilor electroforetice, izoenzimele din muşchii de păsări, reptile şi unele amfibii ar corespunde tipurilor LD_3 şi LD_4 din modelul izoenzimatic al muşchiului de mamifer, luat ca sistem de referinţă; în cazul peştilor însă, izoenzimele respective corespund ca poziţie tipului LD_2 din modelul izoenzimatic al mamiferelor. Totuşi, dacă se adoptă această alternativă, apare uneori dificilă — cel puţin în unele din cazurile semnalate — interpretarea, pe baza ipotezei acreditate, care implică existenţa celor două forme izoenzimatice paren-

tale genetic controlate şi a celor trei forme hibride, ipoteză verificată în cazul ţesuturilor de mamifer [13]—[18]

Cea de-a doua alternativă apare evident mai simplă, deoarece, excluzînd referirea la modelul clasic reprezentat de izoenzimele din muşchii de mamifer, fracţiunea rapidă identificată în muşchii celorlalte vertebrate ar putea fi asimilată tipului „B", iar cea lentă (inclusiv subfracţiunile) tipului „A", fracţiunile intermediare constituind hibrizii respectivi. Unele dificultăţi pot apărea însă şi în acest caz, datorită faptului că gradul de eterogenitate al izoenzimelor LD este oarecum diferit, în funcţie de treapta evolutivă ocupată de specia respectivă.

Intenţia acestor consideraţii a fost de a sublinia paralelismul dintre comportarea electroforetică a izoenzimelor LD din muşchii speciilor cercetate şi aceea a izoenzimelor din creierul aceloraşi specii de vertebrate, investigate de noi anterior [2]—[3]. Într-adevăr, în cadrul aceleiaşi specii, atît izoenzimele LD din creier, cît şi cele din muşchi prezintă o comportare electroforetică similară, indiferent de treapta de evoluţie filogenetică pe care se află speciile respective. Acest paralelism sugerează că, la nivelul izoenzimelor LD, diferenţele dintre specii sînt mai evidente decît diferenţele dintre organele aceleiaşi specii (creier, muşchi). Transpusă pe un plan mai general, această remarcă reflectă relaţiile de unitate şi diversitate în contextul evoluţiei biochimice a speciilor.

Distribuţia activităţii enzimatice pe diferite fracţiuni ale modelului izoenzimatic muscular este prezentată în tabela 1. Ca o caracteristică generală, se remarcă concentrarea acestei activităţi pe fracţiunile cele mai lente, aparţinînd tipului parental „A" („M"). Predominanţa formei „A", care operează în prezenţa unor praguri mai ridicate de piruvat, reflectă preponderenţa în ţesutul muscular a proceselor de tip anaerob, indiferent de treapta evolutivă ocupată de specia respectivă.

Sub acest aspect, făcînd o paralelă cu izoenzimele LD din creier, distribuţia activităţii izoenzimelor LD din muşchi manifestă o uniformitate mai mare în seria vertebratelor, indicînd existenţa aceluiaşi profil metabolic anaerob. La creier însă, această distribuţie prezintă particularităţi distinctive, în funcţie de treapta de evoluţie filogenetică, variaţiile semnalate fiind o expresie a sensului evoluţiei biologice a vertebratelor. Referitor la această caracteristică, noi am evidenţiat şi am descris anterior [3] „fenomenul deplasării activităţii enzimatice", de pe tipul „A" către tipul „B", în cursul evoluţiei creierului. Acest fenomen denotă nu numai schimbări evolutive şi adaptări ale sistemului proteic-enzimatic, ci şi modificări ale proceselor metabolice, corelate, evident, cu particularităţile funcţionale ale creierului, ca expresie a însăşi evoluţiei acestuia. În schimb, caracterul distribuţiei activităţii izoenzimatice LD în muşchii de vertebrate, cu predominanţa exclusivă a fracţiunilor lente, sugerează că aparatul contractil muscular nu a suferit în cursul evoluţiei, modificări fiziologice şi biochimice profunde, aşa cum este, de pildă, cazul ţesutului cerebral. De altfel, această constatare a rezultat şi din comportarea izoenzimelor aldolazei din muşchii diferitelor vertebrate [4]. Caracteristica metabolică a ţesutului muscular, reflectată şi de semnificaţia profilului izoenzimatic, sugerează totodată că izoenzimele LD prezintă un grad mare de omologie filogenetică. Acest fapt ne permite să postulăm că în

arborele evolutiv ele şi-au păstrat unele particularităţi cu semnificaţie metabolică, determinate de un precursor ancestral comun.

Valorile activităţii totale a LD din muşchi sînt redate în tabela 2.

Tabela 2

Valorile activităţii lacticodehidrogenazei din muşchii scheletici la diferite specii de vertebrate

Clase / specii	U. LDH 10^3/mg prot.
Mamifere	
şobolan	11,1 ± 1,20
iepure	10,3 ± 1,50
bou	11,2 ± 0,12
Păsări	
porumbel	5,1 ± 0,70
găină	5,0 ± 0,36
Reptile	
şarpe	8,2 ± 1,40
broasca ţestoasă	6,4 ± 1,65
Amfibii	
broască	7,5 ± 0,15
triton	7,2 ± 0,67
Peşti	
crap, caras	4,2 ± 0,55

După cum rezultă din aceste valori, enzima este în general foarte activă, prezentînd anumite variaţii, în funcţie de specie. Se remarcă astfel diferenţe semnificative între valorile ridicate ale activităţii LD din muşchiul de mamifer şi valorile scăzute din muşchiul de peşte. Celelalte specii prezintă valori intermediare. Faptul că activitatea enzimatică LD din ţesutul muscular este mai crescută la mamifere sugerează posibilitatea ca, la acestea, procesele de tip anaerob să fie mai accentuate decît cele din muşchii celorlalte specii de vertebrate cercetate. Spre deosebire însă de activitatea LD din creier, care prezintă o creştere regulată de la mamifere la amfibii şi peşti, adică tocmai în sensul în care se face deplasarea activităţii de la tipul izoenzimatic „B" către tipul „A", valorile activităţii totale a LD din muşchi nu pot fi ordonate după asemenea reguli.

CONCLUZII

S-a evidenţiat polimorfismul izoenzimelor lacticodehidrogenazei din muşchii scheletici ai unor specii de vertebrate situate pe trepte de evoluţie diferită.

Gradul de eterogenitate, mobilitatea electroforetică şi raporturile cantitative dintre diferitele tipuri de izoenzime LD musculare prezintă deosebiri în funcţie de specie, respectiv de treapta evolutivă.

Activitatea enzimatică LD din mușchiul de mamifere este mai crescută decît la celelalte specii de vertebrate.

Trăsăturile comune evidențiate la nivelul izoenzimelor LD din mușchi sugerează că aparatul contractil nu a suferit modificări biochimice profunde în cursul evoluției, așa cum este, de pildă, cazul țesutului cerebral.

Prezentată la redacție la 18 decembrie 1968

Institutul de biochimie al
Academiei Republicii Socialiste România

BIBLIOGRAFIE

1. M. Șerban, St. cerc. biochim., *3*, 287 (1967).
2. M. Șerban, D. Cotariu, *Abstracts of the Vth Meeting FEBS, Prague*, 1968, p. 262.
3. M. Șerban, D. Cotariu, Rev. roum. Biochim., *4*, 325 (1968).
4. D. Cotariu, M. Șerban, Rev. roum. Biochim., *1*, 11 (1969).
5. A. C. Wilson, N. O. Kaplan, L. Levine, A. Pesce, M. Reichlin, W. S. Allison, Fed. Proc., **23**, 1258 (1964).
6. A. Pesce, T. P. Fondy, F. Stolzenbach, F. Castillo, N. O. Kaplan, J. biol. Chem., **242**, 2151 (1967).
7. M. Șerban, Rev. roum. Biochim., *4*, 211 (1967).
8. M. Șerban, Rev. roum. Biochim., *4*, 367 (1965).
9. M. D. Poulick, Nature, Lond., **180**, 1477 (1957).
10. H. J. Van Der Helm, Lancet, *11*, 108 (1961).
11. E. S. Vessel, I. A. Brody, Ann. N. Y. Acad. Sci.,**121** 544 (1964).
12. H. U. Bergmeyer, în *Methods of enzymatic analysis*, Verlag Chem., Acad. Press, Heidelberg — Londra — New York, 1965, p. 736.
13. P. G. W. Plageman, K. F. Gregory, F. Wroblewski, J. biol. Chem., **235**, 2288 (1960).
14. C. J. Epstein, M. M. Carter, R. F. Goldberger, Biochim. biophys. Acta, **92**, 391(1964).
15. M. Hinks, C. J. Masters, Biochim. biophys. Acta, **130**, 458 (1966).
16. J. F. Houssais, Biochim. biophys. Acta, **128**, 239 (1966).
17. N. Ressler, K. Stitzer, Biochim. biophys. Acta, **146**, 1 (1967).
18. J. A. Bolotina, D. S. Marcovich, M. V. Volkenstein, P. Zavodsky, Biochim. biophys. Acta, **132**, 271 (1967).

COMPARATIVE BIOCHEMISTRY OF ISOENZYMES. IV. LACTATE DEHYDROGENASE ISOENZYME IN SKELETAL, MUSCLES, IN THE PHYLOGENY OF VERTEBRATES

SUMMARY

The heteromorphism of skeletal muscle lactate dehydrogenase (LD) isoenzymes was evidenced in the phylogeny of vertebrates. Depending on the species, LD isoenzyme pattern exhibits several peculiarities concerning the heterogeneity degree, the electrophoretic mobility and the quantitative ratios between fractions. LD enzyme activity is increased in mammal muscles as compared to other vertebrate species. The common features and the specific differences between muscle and brain LD isoenzymes in the phylogeny of vertebrates are discussed.

ASPECTE PRIVIND BIOSINTEZA PIGMENȚILOR CAROTINOIDICI

GAVRIL NEAMȚU

Cunoașterea biosintezei pigmenților carotinoidici constituie o problemă de mare însemnătate teoretică și practică, fapt pentru care numeroși cercetători caută să-și aducă contribuția la cunoașterea formării *in vivo* a acestor pigmenți, atît de larg răspîndiți în natură [7], [17], [21], [26], [43].

Cele mai numeroase cercetări despre biosinteza carotinoidelor s-au efectuat, în primul rînd, pe organisme neclorofiliene, cum sînt ciupercile, drojdiile, bacteriile nefotosintetizante, precum și pe rădăcini de morcovi și fructe de tomate, unde lipsa fotosintezei ușurează observarea proceselor biogenetice [43]. Ciupercile și bacteriile sînt deosebit de potrivite pentru cercetarea biosintezei carotinoidelor, deoarece sînt ușor și reproductibil de cultivat, produc adesea un singur pigment esențial (excepție *Neurospora crassa*), procedeele de extragere a carotinoidelor sînt simple, iar lipsa clorofilelor ușurează punerea în evidență a unor cantități mici de pigmenți carotinoidici.

Studiul biosintezei carotinoidelor la organismele clorofiliene s-a făcut mai mult pe alge verzi (*Chlorella* și *Scenedesmus*), flagelate (*Euglena gracilis*, *E. vulgare*) și diatomee, iar la fanerogame pe plantule etiolate de grîu și porumb [7]. Puține cercetări s-au făcut pe frunze adulte, iar din lipsa unei tehnici potrivite nici una nu s-a efectuat înainte de 1952 [7]. Se cunosc de asemenea foarte puține lucrări privind biosinteza carotinoidelor florale [33].

I. PRECURSORI AI PIGMENȚILOR CAROTINOIDICI

a. Precursori cu catenă scurtă

1. *Bioxidul de carbon.* Goodwin [20] a constatat că, în timpul înverzirii plantulelor de porumb expuse la lumină, $^{14}CO_2$ (din atmosferă) este rapid încorporat în β-carotină. Costes [10] pune în evidență încorporarea $^{14}CO_2$ din soluții nutritive în carotinoidele hidrocarburice și oxigenate, atît la lumină, cît și la întuneric.

2. *Acidul acetic.* Grob și colab. [21], [22] au obținut β-carotină marcată din *Mucor hiemalis* crescut pe un mediu ce conținea acid acetic marcat la C_1 și C_2. Prin oxidarea β-carotinei cu acid cromic s-a obținut acid acetic din atomii de carbon 9, 9′, 13, 13′, 5, 5′ și din grupările metil atașate. Atomii de carbon 15 și 15′ s-au dovedit a fi de asemenea derivați din carbonul grupării carboxilice a acidului acetic, confirmînd prin aceasta că sinteza moleculei de β-carotină se obține prin condensarea „coadă la coadă" a două unități C_{20}. Prin experiențe cu izotopi radioactivi s-a sta-

bilit ulterior că atomii de carbon 1, 1′, 3, 3′ provin din carbonul grupării carboxilice a acidului acetic. Carbonul din gruparea metilică a acidului a fost localizat în pozițiile 2,2′, 4,4′, 6,6′, precum și în grupările metil atașate la atomii de carbon 1,1′, 5, 5′, 9,9′, 13, 13′.

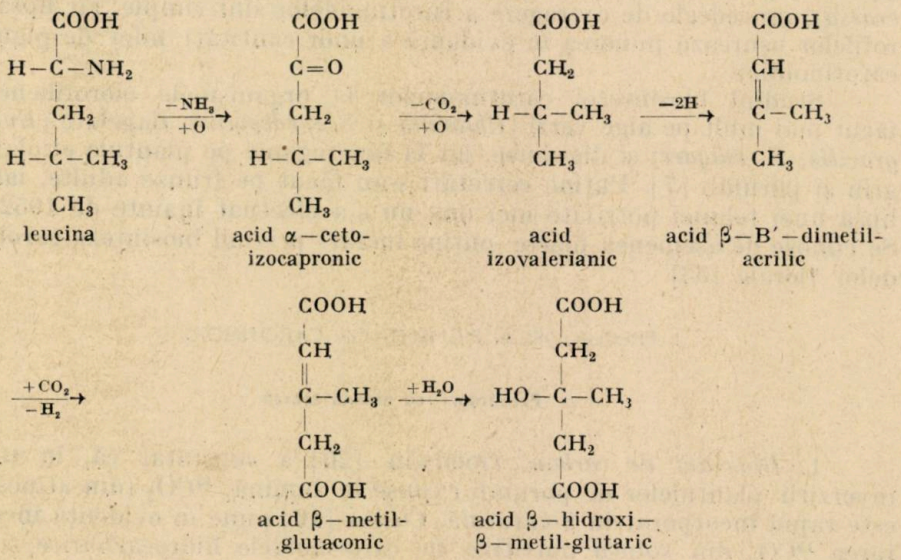
Goodwin susține că biosinteza unității izoprenoidice a β-carotinei se realizează prin condensarea a trei molecule de acid acetic, cu eliminarea unei molecule de CO_2 [17].

Dintre precursorii carotinoidelor cu catenă scurtă mai amintim: acidul piruvic, glicerolul, acidul acetil-acetic, acidul glutamic, l-alanina, colina, prolina etc. [13], [17], [43].

b. Precursori cu catenă ramificată

1. *Leucina.* Prin experiențe s-a constatat că leucina are un efect stimulator asupra biosintezei β-carotinei din ciuperci și frunze [14], [17]. Cercetările întreprinse cu atomi marcați arată că atomul de carbon al grupării carboxilice din molecula leucinei se elimină sub formă de CO_2, iar restul atomilor de carbon din moleculă contribuie la formarea unității izoprenoidice C_5.

Leucina poate fi transformată în acid β-hidroxi-β-metil-glutaric prin intermediul unor substanțe care de asemenea pot fi folosite ca precursori ai carotinoidelor, dar care se încorporează mult mai greu decît leucina. Schema acestor transformări se prezintă astfel:



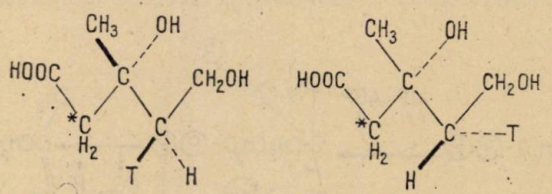
Leucina s-a dovedit a fi mai activă în biosinteza carotinoidelor decît acidul 4,4′-^{14}C-dimetil-acrilic, aldehida 4,4′-^{14}C-dimetil-acrilică, alcoolul izoamilic etc., care de asemenea sînt precursori ramificați [20].

2. *Acidul mevalonic* (*MVA*). Acidul mevalonic este considerat ca precursorul de bază al izoprenului în sinteza squalenului [3]. Experimentîndu-se ulterior și în biosinteza carotinoidelor pe *Phycomyces blakesleeanus*, *Neurospora crassa*, *Lactobacillus acidophilus*, *Staphylococcus aureus*, omogenat de morcovi, omogenat de tomate, fructe de tomate [43], s-a constatat că și în biosinteza carotinoidelor el este un precursor principal, care

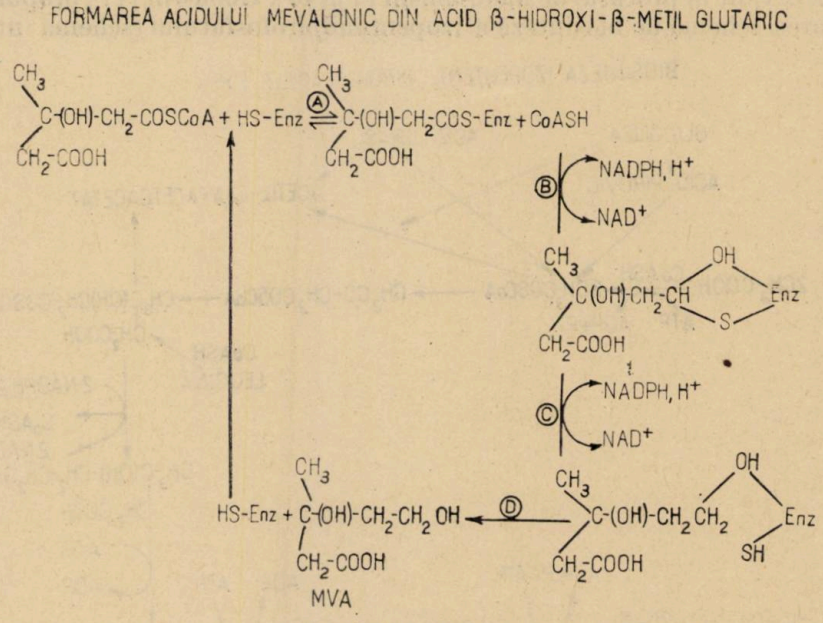
contribuie la formarea izopentenilpirofosfatului, unitatea biologic activă de bază în formarea carotinoidelor. Acidul mevalonic este încorporat în molecula carotinoidelor de zece ori mai repede decît acidul acetic. Carbonul grupării carboxilice se pierde și în cazul acestui precursor sub formă de CO_2, iar unitățile C_5 rămase se condensează între ele și formează precursori superiori, inclusiv carotinoide.

Experiențele cu *Euglena gracilis* [43] au indicat că opt molecule de MVA (pierzînd opt molecule de CO_2) se condensează pentru a forma o moleculă de β-carotină.

Popják și Cornforth [34] au sintetizat în 1960 două feluri de acid mevalonic: [2-^{14}C-4 R-^{3}H] (A) și [2-^{14}C-4 S-^{3}H] (B) și au arătat că eliminarea protonului de la C_4 al acidului mevalonic este sterospecifică. Cercetările lui Goodwin și Williams [18] au arătat că numai MVA [2-^{14}C-4 R-^{3}H] este activ în biosinteza sterolilor și a carotinoidelor.



Acidul mevalonic se poate forma din mai mulți precusrori, dintre care acidul β-hidroxi-β-metil-glutaric are rolul principal. Goodwin [17] propune următoarea schemă de formare a acidului mevalonic din acidul β-hidroxi-β-metil-glutaric (schema nr. 1):

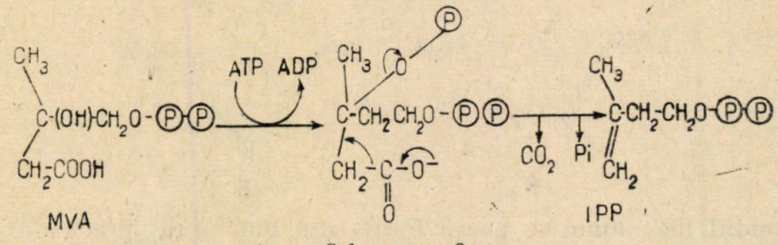


Schema nr. 1

3. *Izopentenilpirofosfatul (IPP).* Descoperirea izopentenilpirofosfatului ca unitate biologic activă în biosinteza carotinoidelor și a altor substanțe cu structură poliizoprenică constituie una din cele mai mari realizări ale biochimiei moderne [44]. Numai după descoperirea izopentenilpirofosfatului s-au putut elabora mecanisme în ceea ce privește formarea atît a catenei carbonice aciclice a carotinoidelor, cît și a sistemelor iononice ciclice.

Precursorii terpenoidelor pînă la MVA necesită reacții electrofilice, în care coenzima A acționează prin creșterea deficitului de electroni la carbonul grupării carboxilice. Transformarea MVA în IPP se face prin activarea MVA sub formă de esteri fosforici, care, sub influența kinazei mevalonice, a kinazei fosfomevalonice, a anhidrodecarboxilazei și în prezența unor cofactori ca ATP și Mn^{2+}, formează IPP. Mecanismul acestor transformări este redat în schema nr. 2.

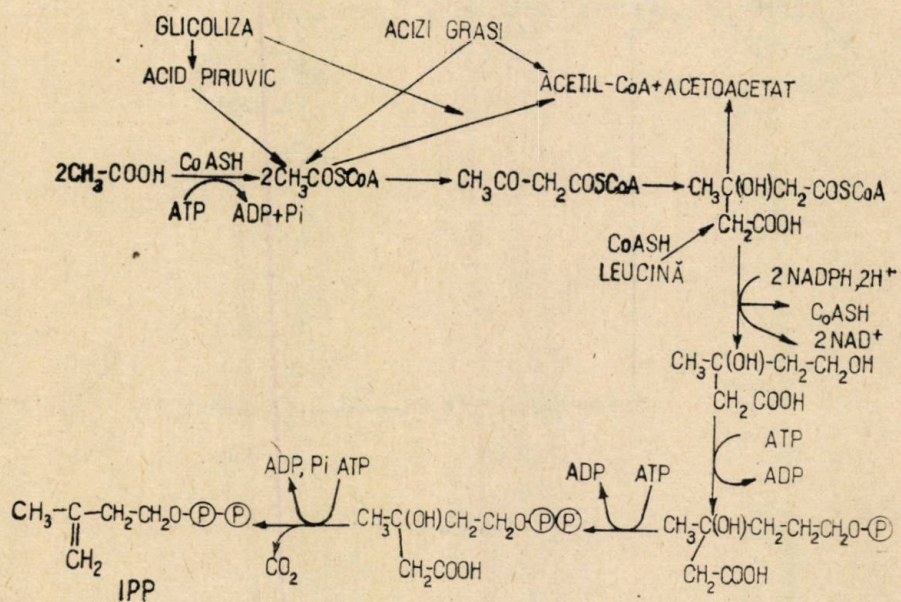
TRANSFORMAREA ACIDULUI MEVALONIC ÎN IZOPENTENILPIROFOSFAT



Schema nr. 2

Cercetările din ultimul timp, cu ajutorul izotopilor radioactivi, au arătat că izopentenilpirofosfatul se poate forma și din alte substanțe ce apar frecvent în procesul de metabolism [7],[43]. Goodwin [17] propune următoarea schemă de biosinteză a izopentenilpirofosfatului (schema nr. 3):

BIOSINTEZA IZOPENTENIL PIROFOSFATULUI (IPP)



Schema nr. 3

Varma și Chichester [44] au preparat IPP-^{14}C din 2-^{14}C MVA și au găsit că eficacitatea încorporării IPP în licopină (în omogenatul de tomate) este de 40 de ori mai mare decît cea a MVA. În mediu de azot și în prezența iodacetamidei, IPP, asemănător 2-^{14}C MVA, nu s-a încorporat în molecula β-carotinei și a sterolilor. Această constatare arată că și IPP poate să constituie un intermediar comun atît în biosinteza carotinoidelor, cît și în aceea a sterolilor.

c. Precursori cu lanț lung

1. *Citralul și geraniolul.* Încorporarea ^{14}C-citralului și a ^{14}C-geraniolului în molecula β-carotinei se face mai repede decît cea a acidului mevalonic în aceleași condiții· ^{14}C-citralul s-a identificat în frunzele de eucalipt [44] lăsate să fotosintetizeze în prezența $^{14}CO_2$, iar geraniolul în petale de iasomie. În laborator, geraniolul se formează prin reducerea citralului cu $NaBH_4$ și prin condensarea a două molecule de IPP.

Geraniolul este un precursor mai activ decît citralul în sinteza β-carotinei. Transformarea citralului în geraniol a fost observată și în rădăcinile de morcovi [45].

2. *Alcooli terpenici.* Dintre alcoolii terpenici cu rol important în biosinteza carotinoidelor, alături de geraniol, amintim linalolul, farnesolul, geranilgeraniolul, geranillinalolul etc. Acești alcooli, precum și esterii lor pirofosforici sînt cu mult mai repede încorporați în β-carotină decît precursorii anteriori. Alcoolii terpenici amintiți se pot forma din MVA [43].

Simpson, în 1961, a preparat farnesilpirofosfatul-C_{15} tot din acid mevalonic, folosind enzime din ficatul de șobolan [41], iar Grob [22] a extras o enzimă din drojdia de bere, care catalizează reacția de combinare a farnesilpirofosfatului cu IPP.

Beeler și colab [3], [5] au descoperit în tomate un compus asemănător cu licopersenul și astfel pare posibil ca două unități C_{20}-geranilgeraniolul și geranillinalolul — să se condenseze pentru a forma o unitate primară C_{40}, așa cum farnesilpirofosfatul se condensează cu nerolidolpirofosfatul pentru a da squalenul [43].

Dintre alcoolii terpenici, geranilgeraniolul are un rol mai important, deoarece poate să contribuie la formarea atît a carotinoidelor, cît și a fitolului din clorofile [8].

Încorporarea acestor precursori în pigmenții carotinoidici, în steroli și în alte substanțe izoprenoidice arată înrudirea ce există între grupele de substanțe cu structură poliizoprenoidică.

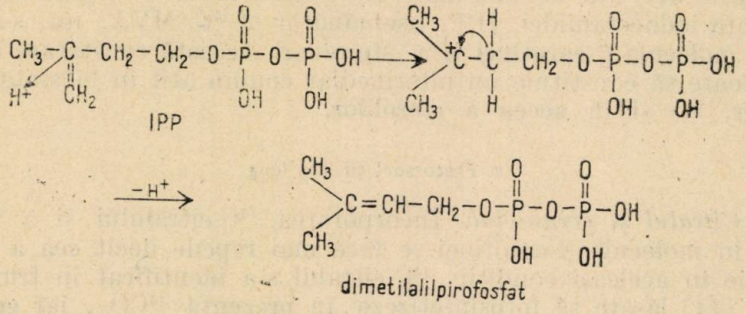
II. MECANISMUL FORMĂRII CAROTINOIDELOR ACICLICE ȘI CICLICE

a. Formarea tetraterpenelor aciclice

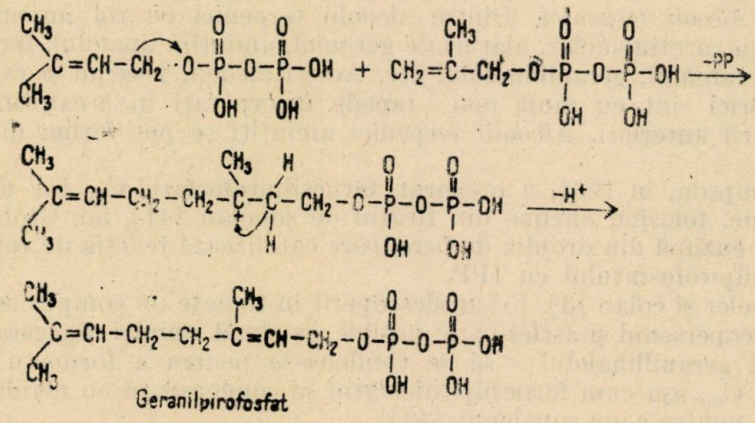
Cercetările întreprinse în ultimul timp cu izotopi radioactivi au reușit să aducă date prețioase privind cunoașterea mecanismului de formare a tetraterpenelor aciclice, substanțe ce stau la baza carotinoidelor ciclice·

Formarea precursorilor superiori și a carotinoidelor începe cu izomerizarea IPP în dimetilalilpirofosfat [17]. Această izomerizare se reali-

zează prin expulzarea unui proton de la C_4 original al acidului mevalonic, conform următorului mecanism :



Formarea geraniolului C_{10} se realizează prin condensarea unei molecule de IPP cu o moleculă de dimetilaliplirofosfat. Această condensare se produce tot prin expulzarea unui proton de la C_4 original al acidului mevalonic, conform mecanismului de mai jos :



La formarea geraniolului din IPP se elimină în total 2 protoni prin mecanismul arătat.

Ceilalți precursori superiori, ca farnesilpirofosfatul C_{15}, geranilgeraniolpirofosfatul C_{20}, diferite tetraterpene aciclice, se pot forma tot din IPP, prin eliminarea protonilor de la C_4, după același mecanism. Numeroși cercetători [7], [17], [18], [36], [43] consideră că fitoenul este prima tetraterpenă aciclică ce se formează în procesul de biogeneză a carotinoidelor. Prin reacții de dehidrogenare, fitoenul se poate transforma în fitofluen, ξ-carotină, neurosporen și licopină. Tetraterpenele menționate au fost identificate în natură și pot constitui produși intermediari în biosinteza carotinoidelor ciclice.

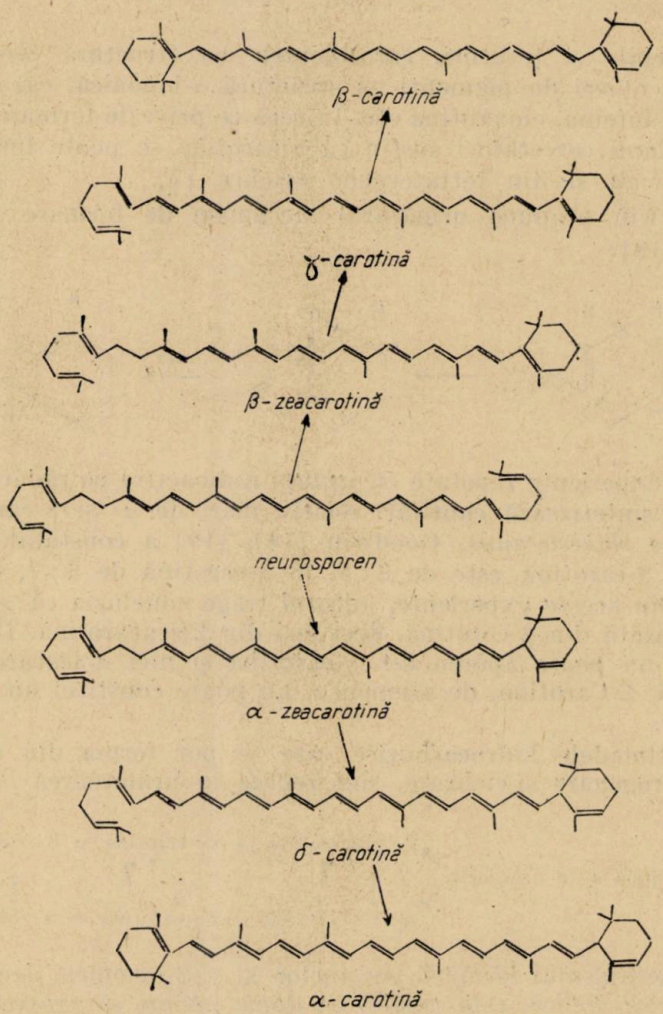
b. Formarea sistemelor ciclice

O altă problemă puțin cunoscută în biosinteza carotinoidelor este mecanismul de formare a sistemelor iononice ciclice. Goodwin și Williams, pe baza experiențelor cu izotopi radioactivi făcute pe *Phycomyces bla-*

kesleeanus și pe țesuturi de morcovi cultivate în soluții nutritive, au reușit să redea mecanismul de formare a sistemelor β- și α-iononice [18], [19].

În procesul de formare a carotinoidelor ciclice, autorii atribuie un rol însemnat neurosporenului, care poate să stea la baza formării principalelor carotinoide hidrocarburice și oxigenate. Din neurosporen, prin dehidrogenare se poate forma licopina, iar prin ciclizarea acesteia la un capăt, carotinoide monociclice.Carotinoidele biciclice se pot forma fie prin ciclizarea neurosporenului la ambele capete, fie prin ciclizarea carotinoidelor cu structură pseudoiononică. Capătul moleculei neurosporenului, direct legat de lanțul lung al dublelor legături, este acela care se ciclizează prima dată, pentru a forma β-zeacarotină sau α-zeacarotină, iar acestea, prin dehidrogenare la atomii de carbon C_7, C_8, formează γ- și, respectiv,

Formarea corotinoidelor ciclice din neurosporen

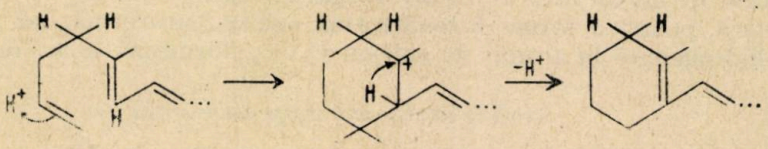


Schema nr. 4

δ-carotină. Carotinoidele monociclice constituie faze intermediare în formarea α- și β-carotinei [17], [18].

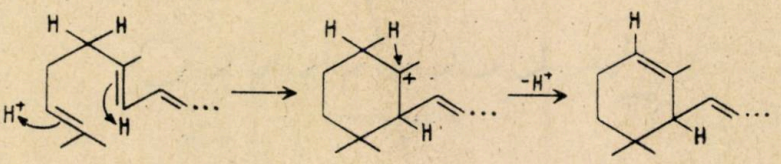
În formarea β-carotinei, Goodwin [18] arată că fitoenul se dehidrogenează treptat în fitofluen, ξ-carotină și neurosporen, care se ciclizează la un capăt și formează β-zeacarotină. Această carotinoidă, prin dehidrogenare, formează γ-carotină, iar prin ciclizare β-carotină.

Mecanismul de formare a sistemului β-ononic se prezintă astfel [18]:



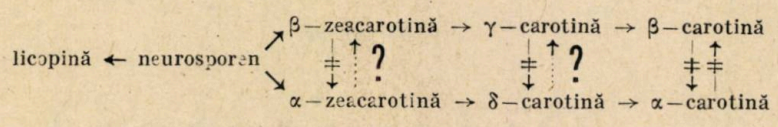
În celule și țesuturi, carotinoidele cu structură β-ononică sînt însoțite de obicei de pigmenți cu structură α-ononică, ca, de exemplu, α-carotina, luteina, eloxantina etc. În ceea ce privește formarea sistemului α-ononic, unii cercetători susțin că α-carotina se poate forma atît din β-carotină, cît și din tetraterpene aciclice [7].

Goodwin propune următorul mecanism de formare a sistemului α-ononic [19]:



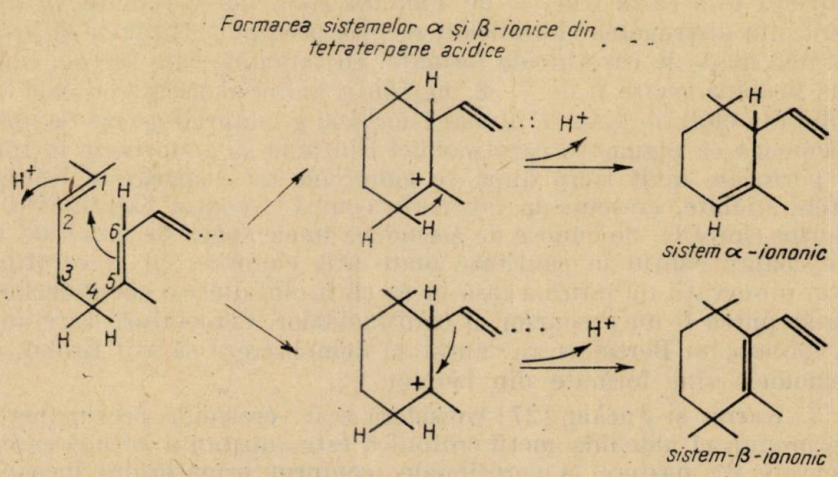
Prin experiențe repetate cu izotopi radioactivi pe rădăcini de morcovi, care sintetizează cantități relativ mari de α- și β-carotină, și pe *Phycomyces blakesleeanus*, Goodwin [18], [19] a constatat că raportul $^{14}C/^{3}H$ în β-carotină este de 8 : 6, în α-carotină de 8 : 7, iar în fitoen de 8 : 8. Din aceste experiențe, autorul trage concluzia că α-carotina nu este sintetizată din β-carotină, deci nici din β-zeacarotină. De asemenea, δ-carotina nu poate apărea din γ-carotină și nici α-zeacarotină din β-zeacarotină. β-Carotina, de asemenea, nu poate constitui un precursor al α-carotinei.

Carotinoidele hidrocarburice care se pot forma din neurosporen, prin dehidrogenare și ciclizare, sînt redate în următoarea schemă:



În mecanismul formării sistemelor α- și β-ononice, deci al formării carotinoidelor ciclice, este posibil ca două enzime să provoace formarea aceluiași ion de carboniu nestabil. Pentru formarea sistemului α-ononic se

elimină un proton de la C_4, iar pentru formarea sistemului β-iononic se elimină un proton de la C_6 [46].



Schema nr. 5

Din această schemă se observă că sistemele α- și β-iononice se formează independent din sisteme pseudoiononice și, deci, n-ar exista o transformare directă a sistemelor β-iononice în sisteme α-iononice și invers.

În general, se constată că toate reacțiile de formare a tetraterpenelor aciclice, reacțiile de izomerizare a polienilor incolori și de formare a sistemelor α- și β-iononice se realizează prin eliminarea de atomi de hidrogen. Aceste reacții de dehidrogenare sînt catalizate în organism de anumite sisteme enzimatice, dintre care un rol important are NAD [7].

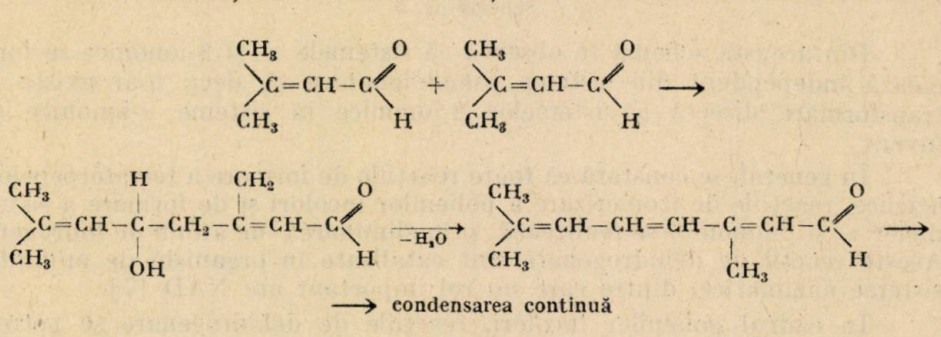
În cadrul polienilor incolori, reacțiile de dehidrogenare se petrec numai la nivelul catenei carbonice aciclice. Ele se pot petrece însă și în interiorul sistemelor iononice ciclice, cu formare de dehidro-carotinoide, care pot să participe activ la procesele de biogeneză. Dehidrocarotinoidele, prin faptul că au în moleculă mai multe duble legături conjugate, sînt mult mai reactive și pot să dea cu ușurință reacții de adiție, hidroxilare, oxidare, reducere, izomerizare, contribuind în felul acesta la formarea unui mare număr de pigmenți carotinoidici.

III. IPOTEZE ȘI TEORII DESPRE BIOSINTEZA PIGMENȚILOR CAROTINOIDICI

1. Prima ipoteză asupra biosintezei carotinoidelor a fost dată în 1837 de Berzelius, care, extrăgînd cu ajutorul alcoolului etilic xantofile din frunze îngălbenite de toamnă, consideră carotinoidele ca produși de degradare a clorofilelor. Deși ulterior s-au identificat pigmenți carotinoidici și în frunzele verzi, ipoteza lui Berzelius a avut o mare influență asupra celorlalți cercetători. Astfel, Willstätter și Mieg [47] au căutat să demonstreze că sursa de formare a carotinoidelor o constituie fitolul din clorofilele a și b. Acești autori consideră că, în fructele care se coc, fitolul

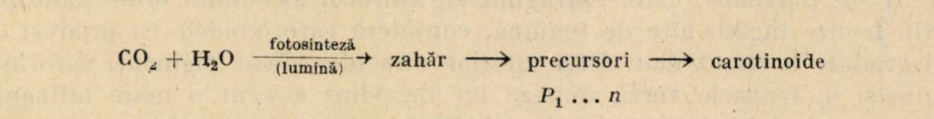
eliberat în urma distrugerii clorofilelor contribuie la formarea carotinoidelor prin reacții de dehidrogenare și condensare. Prin cercetări ulterioare s-a dovedit însă că în fructele de *Physalis alkekengi* și tomate, în timpul coacerii, din distrugerea clorofilelor, rezultă prea puțin fitol ca să justifice cantitatea mare de carotinoide formate. În tomatele care se coc, cantitatea de licopină poate fi de 7—8 mg/100 g material uscat, pe cînd cea a fitolului din clorofile este de numai 1 mg/100 g material uscat. Se observă de asemenea că pigmenții carotinoidici continuă să se formeze în tomate și în portocale mult timp după ce clorofilele au dispărut în întregime. Plantele etiolate, crescute la întuneric complet, conțin carotinoide, deși nu conțin clorofile. Se cunosc de asemenea unele specii de ardei ale căror fructe coapte conțin în cantitate mare atît clorofile, cît și carotinoide. Aceste observații nu infirmă însă ideea că fitolul dintr-o sursă neclorofiliană n-ar putea fi un precursor al carotinoidelor. Cercetătorii care au susținut ipoteza lui Berzelius au căutat să demonstreze că atît fitolul, cît și carotinoidele sînt formate din izopren.

2. Karrer și Jucker [27] consideră mai verosimilă presupunerea că nu izoprenul, ci aldehida metil-crotonică este substanța inițială care prin condensare dă naștere la carotinoide, conform următorului mecanism :



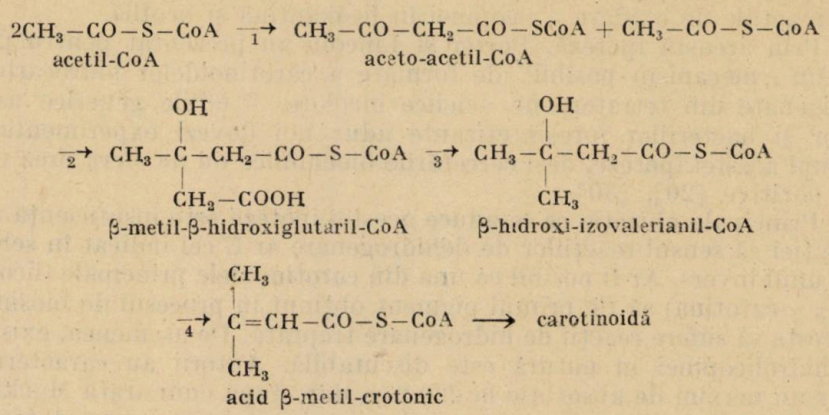
Această ipoteză subliniază analogia strînsă a sintezei carotinoidelor cu ipoteza formării lipidelor din hidrocarburi în organismele mamifere.

3. Bandurski [2] face prima încercare de sistematizare a biosintezei carotinoidelor foliare. Prin experiențe cu frunze de fasole în soluții nutritive arată că biosinteza carotinoidelor se poate face și la întuneric, dar că ea este mult stimulată la lumină. Autorul arată că atît fotosinteza, cît și respirația au o influență pozitivă asupra carotenogenezei. Prin adăugarea glucozei și a zaharozei în mediul nutritiv s-a stimulat foarte mult biosinteza carotinoidelor, fapt pentru care Bandurski trage concluzia că degradarea aerobă a glucidelor dă naștere la metaboliți precursori ai carotinoidelor și propune următoarea schemă generală, care permite situarea biosintezei carotinoidelor în metabolismul celular :



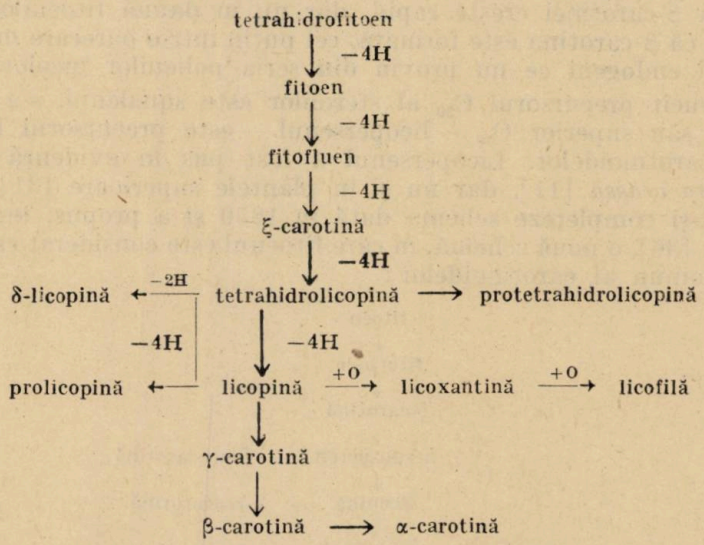
4. Ținînd seama de importanța pe care o are acetil-CoA în procesele metabolice, Goodwin [15] consideră că pigmenții carotinoidici se pot

forma din acetil-CoA, după următoarea schemă :



Reacțiile 1, 2 și 3 au fost demonstrate în omogenat de ficat și semințe de in, dar reacția 4 nu a fost încă demonstrată în țesuturi de plante [1], [32]. Acidul β-metil-crotonic a fost sintetizat, din acetat marcat, numai de *Phycomyces blakesleeanus* [16]. Grob și Bütler [21] susțin că acetil-CoA este punctul de plecare în carotenogenoză la *Mucor hiemalis*, cînd glucoza este singura sursă de carbon. Datele ulterioare au arătat că acidul β-metil-crotonic și aldehida β-metil-crotonică nu sînt precursorii activi în formarea carotinoidelor [20].

5. O ipoteză care a avut un mare merit în stimularea cercetărilor privind biogeneza carotinoidelor a fost cea a lui Porter și Lincoln [35], care au propus următoarea schemă de biosinteză a pigmenților carotinoidici :



Această ipoteză interesantă se bazează pe date genetice și pe faptul că toți pigmenții enumerați au fost identificați de autori în tomate. Ea

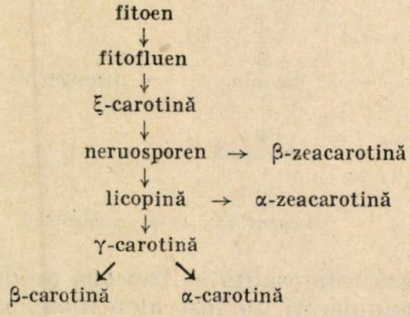
se bazează de asemenea pe reacțiile de dehidrogenare a polienilor incolori, cu formare de licopină, izomerizarea licopinei în α-, β-, γ-carotină, precum și pe reacțiile de oxidare a licopinei în licoxantină și licofilă.

Prin această ipoteză, Porter și Lincoln au prezentat pentru prima dată un „mecanism posibil" de formare a carotinoidelor hidrocarburice și oxigenate din tetraterpene aciclice incolore. Studiile genetice asupra algelor și bacteriilor fotosintetizante aduc noi dovezi experimentale în sprijinul acestei ipoteze, deși cercetările biochimice nu ne oferă prea multe date pozitive [20], [30].

Principala obiecție ce se aduce acestei ipoteze este insuficiența argumentației că sensul reacțiilor de dehidrogenare ar fi cel indicat în schemă, și nu unul invers. Ar fi posibil ca una din carotinoidele principale (licopina, α-, β-, γ-carotina) să fie primul pigment obținut în procesul de biosinteză, iar acesta să sufere reacții de hidrogenare treptată. De asemenea, existența tetrahidrolicopinei în natură este discutabilă. Autorii au caracterizat-o printr-un maxim de absorbție la 220 mμ, dar, după cum arată Mackinney [29], produșii de degradare ai acizilor grași pot foarte ușor să facă neconcludente aceste rezultate. După Rabourn și Quackenbush [37], fitoenul și fitofluenul sînt izomeri, fiind 7, 8, 11, 12, 12′, 11′, 8′, 7′-octahidrolicopină și, respectiv, 7, 8, 9, 10, 10′, 9′, 8′, 7′-octahidrolicopină, deși Koe și Zechmeister [28] au obținut fitofluenul prin dehidrogenarea fitoenului. În schemă nu se face nici o mențiune despre felul cum se formează fitoenul, nici despre faptul că, sub aspect cantitativ, licopina ce se formează în timpul coacerii fructelor depășește cu mult cantitatea polienilor incolori.

Este interesantă, de asemenea, comportarea culturilor de *Phycomyces blakesleeanus* : dacă li se adaugă difenilamină, se formează mai mulți polieni incolori și mai puțină β-carotină. Dacă aceste culturi sînt însă spălate de difenilamină și puse în mediu tampon de fosfați și glucoză, biosinteza β-carotinei crește rapid, dar nu în dauna fitoenilor, ceea ce înseamnă că β-carotina este formată, cel puțin într-o oarecare măsură, din precursori endogeni ce nu provin din seria polienilor incolori.

Întrucît precursorul C_{30} al sterolilor este squalenul, s-a crezut că omologul său superior C_{40} — licopersenul — este precursorul biologic al tuturor carotinoidelor. Licopersenul a fost pus în evidență numai la *Neurospora crassa* [11], dar nu și în plantele superioare [31]. Porter a căutat să-și completeze schema dată în 1950 și a propus, împreună cu Anderson [36], o nouă schemă, în care fitoenul este considerat ca precursorul C_{40} comun al carotinoidelor :



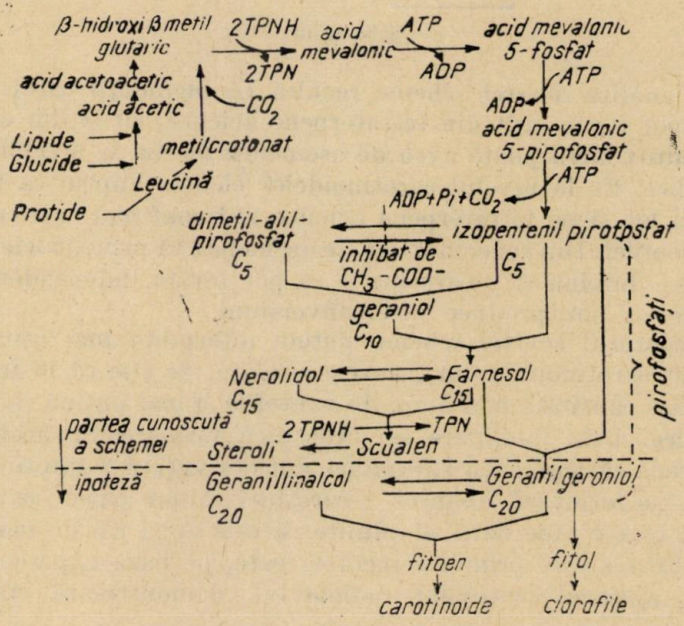
Unii cercetători [24], [25], studiind variația conținutului în polieni aciclici la diferiți mutanți de *Rhodospirillium rubrum* și *Rhodopseudomonas spheroides*, susțin transformările tetraterpenilor, indicate în schema de mai sus. Suzue [42] a demonstrat conversiunea fitoenului marcat în δ-carotină la *Staphylococcus aureus*.

În cloroplaste izolate din fructe de tomate, Beeler și Porter [4] au observat transformarea fitoenului în fitofluen, iar Costes [6] a observat că în cloroplastele frunzelor de porumb fitoenul poate fi utilizat în sinteza enzimatică a β-carotinei, violaxantinei și luteinei. Decker [12] a realizat pentru prima dată conversiunea enzimatică a licopinei marcate în β-carotină, cu ajutorul cloroplastelor din frunzele de sfeclă.

Din cele două scheme ale lui Porter și colab. reiese că licopina poate fi un precursor al carotinoidelor monociclice și biciclice, dar, fără îndoială, nu este singurul. Nu este clarificat rolul oxigenului în dehidrogenarea carotinoidelor aciclice. Oxigenul poate să funcționeze fie ca un reactant obligatoriu în sistem, fie ca un acceptor de electroni. Cercetările mai recente, efectuate pe fructe de tomate, confirmă ipoteza lui Porter și Lincoln în ceea ce privește secvența biosintezei următoarelor tetraterpene aciclice : — fitoen → fitofluen → ξ-carotină → neurosporen → licopină [9], [17].

6. Cercetările de biosinteză a substanțelor terpenoidice, efectuate în ultimul timp, au scos în evidență paralelismul strîns ce există în mecanismul biosintezei carotinoidelor, sterolilor, terpenilor, chinonelor și altor produși din această clasă de substanțe. Etapele comune și corelațiile dintre aceste grupe de substanțe au fost redate în numeroase scheme [17], [38]. Prezentăm schema dată de Costes [7], întrucît reușește să redea mecanismul de formare a mai multor substanțe terpenoidice.

Schema biosintezei compușilor terpenici

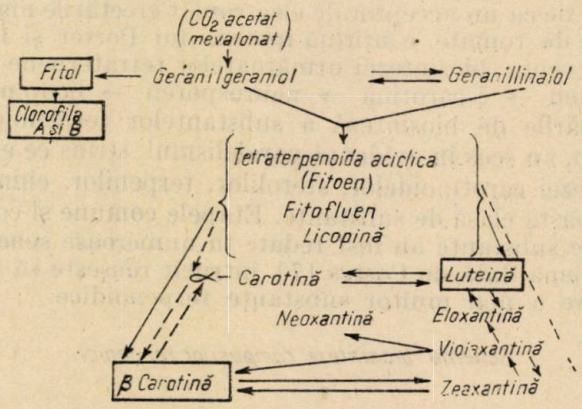


Schema nr. 6

Din schemă rezultă clar rolul precursorilor inferiori (acid acetic, leucină, MVA, IPP) atît în biosinteza carotinoidelor, sterolilor, fitolului, cît și în a celorlalte categorii de substanțe poliizoprenoidice. Reiese de asemenea rolul principal al izopentenilpirofosfatului și al ATP-ului în biosinteza compușilor poliizoprenici.

Din această schemă nu rezultă însă modul de formare a carotinoidelor ciclice (hidrocarburice și oxigenate) și nici corelațiile carotinoidelor cu terpenii superiori.

7. Costes [7], [8], pe baza cercetărilor anterioare și prin contribuțiile sale valoroase privind biosinteza carotinoidelor foliare, a reușit să prezinte ulterior o schemă mai completă de biosinteză a carotinoidelor, din care reies atît rolul precursorilor superiori, cît și interconversiunea dintre principalele carotinoide hidrocarburice și cele oxigenate.



Schema nr. 7

Din analiza acestei scheme rezultă că pigmenții carotinoidici oxigenați se pot forma atît din tetraterpene aciclice, cît și din carotinoidele ciclice. Hidroxilarea poate avea de asemenea loc fie la nivelul tetraterpenelor aciclice, fie la nivelul carotinoidelor ciclice. Faptul că hidroxilarea poate avea loc și pe tetraterpene aciclice ni-l confirmă existența licoxantinei și a licofilei. Din schemă reiese de asemenea că principalele carotinoide din frunze — luteina și β-carotina — se pot forma independent, iar între carotinoide se pot produce interconversiuni.

Cu ajutorul acestei scheme putem interpreta mai ușor biosinteza pigmenților carotinoidici din frunzele etiolate. Se știe că în frunzele etiolate se află o cantitate mai mare de xantofile și mai puține carotinoide hidrocarburice. Prin iluminare se intensifică formarea β-carotinei și este dificil a crede că pigmenții xantofilici sînt derivați ai β-carotinei, deoarece xantofilele se formează înaintea β-carotinei. Acest aspect se poate interpreta însă foarte bine dacă se admite că cele două căi de biosinteză sînt separate. Costes este primul cercetător care, pe baza experiențelor întreprinse cu ajutorul izotopilor radioactivi, demonstrează transformarea

xantofilelor și a epoxizilor în carotinoide hidrocarburice. Transformarea carotinoidelor hidrocarburice în carotinoide oxigenate și invers poate să contribuie la transportul oxigenului rezultat din procesul de fotosinteză sau să pună la dispoziția plantelor oxigen activ, necesar altor procese metabolice.

Din schemă nu rezultă modul în care se face inserția oxigenului în grupările hidroxilice, epoxidice, metoxilice ale carotinoidelor și nu sînt trecuți pigmenții carotinoidici carbonilici și carboxilici. Nu este redată complet nici corelația dintre carotinoide și celelalte substanțe poliizoprenoidice. Costes [7], [8], [10] și alți cercetători [40], prin tratarea carotinoidelor marcate cu cloroplaste active în medii nutritive, au reușit să stabilească relațiile de interconversiune a pigmenților carotinoidici. Acești autori arată că randamentul de încorporare a carotinoidelor aciclice în carotinoidele ciclice din cloroplaste (hidrocarburice și oxigenate) este de 1 000 de ori mai mare decît în cazul acidului mevalonic. Prin aceste experiențe s-a arătat că reacțiile de oxidare a carotinoidelor hidrocarburice sînt enzimatice, iar cele ale xantofilelor sînt neenzimatice. Reacțiile de reducere a carotinoidelor oxigenate sînt toate enzimatice, iar cele ale epoxizilor sînt însoțite și de reacții de izomerizare, ca, de exemplu :

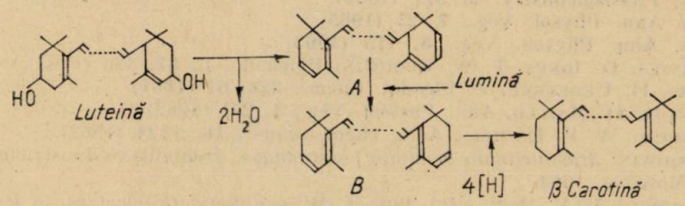
$$\text{violaxantină} \rightarrow \text{eloxantină} + O$$

$$\text{violaxantină} \rightarrow \text{luteină} + 2\,O$$

Introducînd luteină uniform marcată în suspenisa de cloroplaste, Costes [7] a stabilit că luteina se transformă în eloxantină și β-carotină. Reacția de transformare a luteinei în β-carotină este o reacție enzimatică ce se petrece numai la lumină, nu și la obscuritate, și o reprezintă prin următoarea ecuație :

$$\text{luteină} + 4H \xrightarrow{h\nu} \beta\text{-carotină} + 2H_2O$$

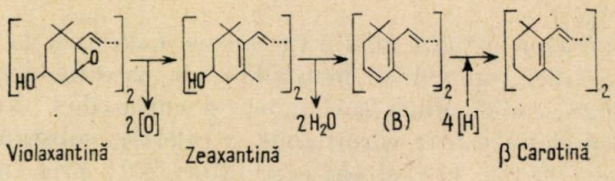
Mecanismul intim al acestei transformări nu se cunoaște, iar autorul [7] propune un mecanism „ipotetic", în care apar ca produși intermediari dehidrocarotinoide (A, B) (schema nr. 8).



Schema nr. 8

Prin utilizarea violaxantinei marcate, s-a constatat că această xantofilă epoxidică se poate transforma în β-carotină atît la lumină, cît și la obscuritate.

Mecanismul de transformare a violaxantinei în β-carotină se realizează, după același autor [7], prin intermediul zeaxantinei și 3, 4, 3′, 4′-bisdehidro-β-carotinei (B).



Schema nr. 9

În general, din schemele prezentate și din reacțiile de interconversiune se observă multiplele posibilități de formare a carotinoidelor în natură. Această varietate de căi biogenetice ne arată, în același timp, dificultatea alcătuirii unei scheme generale de biosinteză a carotinoidelor în diverse organisme. Biosinteza pigmenților carotinoidici nu este un proces mecanic, care să se înfăptuiască în același mod în diverse organisme. Natura carotinoidelor depinde atît de felul organismului, cît și de influența condițiilor de mediu. De aceea, este mai indicată studierea biosintezei carotinoidelor pe unități sistematice mai mici, ca specia, genul, și nu pe familii sau încrengături [33].

Prezentată la redacție
la 10 octombrie 1967

Catedra de biochimie a
Institutului agronomic „Dr. Petru Groza“,
Cluj

BIBLIOGRAFIE

1. B. K. Bachhawat, W. G. Robison, M. I. Coon, J. Amer. chem. Soc., **76**, 3098 (1954).
2. R. S. Bandurski, Bot. Gaz., **41**, 95 (1949).
3. D. A. Beeler, D. G. Anderson, I. W. Porter, Arch. Biochem. Biophs., **102**, 26 (1963).
4. D. A. Beeler, I. W. Porter, Biochem. biophys. Res. Comm., **8**, 367 (1962).
5. D. A. Beeler, I. W. Porter, Arch. Biochem, Biophys., **100**, 167 (1963).
6. C. Costes, C. R. Soc. Biol., **256**, 3535 (1963).
7. C. Costes, *Recherches sur la biosynthèse et le métabolisme des caroténoïdes dans les feuilles*, Thèse de Doctorat ès sciences I.N.R.A., Paris, 1964.
8. C. Costes, Phytochemistry, **5**, 311 (1966).
9. C. Costes, Ann. Physol. Vég., **7**, 25 (1965).
10. C. Costes, Ann. Physiol. Vég., **5**, 115 (1963).
11. B. H. Davies, D. Iones, T. W. Goodwin, Biochem. J., **87**, 326 (1963).
12. K. Decker, H. Ueheleke, Z. Physiol. Chem., **323**, 61 (1961).
13. H. Duranton, H. Maille, Ann. Physiol. Vèg., **4**, 271 (1962).
14. L. Ehrenberg, A. F. Dániel., Acta. chem. scand., **16**, 1524 (1962).
15. T. W. Goodwin, *Sravnitelinaia biohimia karotinoidov*, Izdatelistvo Inostrannoi Literaturi Moscova, 1954.
16. T. W. Goodwin, V. V. Modi, citat după T. W. Goodwin, *Carotenoids*, în *Encyclopedia of Plant Physiology*, sub red. W. RUHLAND vol. X, 1958.
17. T. W. Goodwin, *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, Academic. Press, Londra-New York, 1965, p. 143.
18. T. W. Goodwin, R. J. Williams, Biochem. J., **94**, 1 (1965).
19. T. W. Goodwin, R. J. Williams, Biochem. J., **97**, 3 (1965).
20. T. W. Goodwin, *Carotenoids*, în *Encyclopedia of Plant Physiology*, sub red. W. Ruhland, vol. X, 1958, p. 186.

21. E. C. Grob, R. Bütler, Helv. chim. Acta, **37**, 1908 (1954).
22. E. C. Grob, K. Kirschner, F. Lynen, Chimia, **15**, 308 (1961).
23. A. Jensen, S. L. Jensen, Acta chem. scand., **13**, 1863 (1959).
24. S. L. Jensen, G. Cohen-Bazire, T. O. M. Nakayama, R. Y. Stanier, Biochim. biophys. Acta, **29**, 477 (1958).
25. S. L. Jensen, G. Cohen-Bazire, R. Y. Stanier, Nature, Lond., **192**, 1172 (1961).
26. S. L. Jensen, Acta chem. scand., **15**, 1182 (1961).
27. P. Karrer, E. Jucker, *Carotenoids*, Elsevier Publishing Company Inc., 1950.
28. B. K. Koe, L. Zechmeister, Arch. Biochem. Biophys., **41**, 236 (1952).
29. G. Mackinney, Ann. Rev. Biochem., **21**, 473 (1952).
30. G. Mackinney, în *Comparative Biochemistry of Photoreactive Systemes*, Academic Press, Inc., New York, 1960, p. 205.
31. E. J. Mercer, B. H. Davies, T. W. Goodwin, Biochem. J., **87**, 317 (1963).
32. A. Millerd, I. Bonner, Arch. Biochem. Biophys, **49**, 342 (1954).
33. G. Neamțu, C. Bodea, St. cerc. biochim., **11**, *1*, 39 (1968).
34. G. Popják, J. W. Cornforth, Advanc. Enzymol., **22**, 281 (1960).
35. I. W. Porter, R. E. Lincoln, Arch. Biochem. Biophys., **27**, 398 (1950).
36. I. W. Porter, D. G. Anderson, Arch. Biochem. Biophys., **97**, 520 (1962).
37. W. I. Rabourn, F. W. Quackenbush, Arch. Biochem. Biophys., **61**, 111 (1956).
38. Ph. Reyes, C. O. Chichester, T. O. M. Nakayama, Biochim. biophys. Acta, **90**, 578 (1964).
39. H. Rudney, J. amer. chem. Soc., **76**, 2595 (1954).
40. D. I. Sapojnikov, T. A. Krasovskaia, A. N. Maevskaia, Dokl. Akad. Nauk. SSSR, **113**, 465 (1957).
41. K. L. Simpson, T. O. M. Nakayama, C. O. Chichester, citat după T. N. R. Varma, C. O. Chichester, Food Technol., **3**, 13 (1961).
42. G. Suzue, Biochim. biophys. Acta, **50**, 593 (1961).
43. T. N. R. Varma, C. O. Chichester, Food Technol., **3**, 1 (1961).
44. T. N. R. Varma, C. O. Chichester, Arch. Biochem. Biophys., **96**, 265 (1962).
45. T. N. R. Varma, C. O. Chichester, Arch. Biochem. Biophys., **96**, 419 (1962).
46. R. J. Williams, G. Britton, T. W. Googwin, Biochem. J., **105**, 99 (1967).
47. R. Willstätter, W. Mieg, Liebigs Ann. chem, **355**, 1 (1907).
48. H. Yokoyama, T. O. Nakayama, C. O. Chichester, J. biol. Chem., **237**, 681 (1962).

HANDBUCH DER EXPERIMENTELLEN PHARMAKOLOGIE, vol. XXIII: *Neuro-Hypophysial Hormones and similar polypeptides* (*Hormoni neuro-hipofizari și polipeptide asemănătoare*), sub redacția B. BERDE, Springer, Berlin — Heidelberg — New York, 1968, 967 p.

Impetuoasa dezvoltare din ultimii zece ani a cunoștințelor în acest domeniu, datorită progreselor chimiei polipeptidelor și întrebuințării unor metode biologice specifice, a făcut necesară o încercare de trecere în revistă și de sistematizare a materialului acumulat.

Volumul este o lucrare colectivă (autori: W. Bargmann, P. J. Bentley, B. Berde, G. W. Bisset, R. A. Boissonnas, W. Doepfner, R. J. Fitzpatrick, M. Ginsburg, St. Guttmann, S. Jard, I. Krejci, I. A. Mirsky, F. Morel, R. A. Munsick, J. Rudinger, K. Saameli, W. H. Sawyer, E. Stürmer, N. A. Thorn, H. Tuppy), iar autoritatea specialiștilor care au redactat cele 16 capitole atestă seriozitatea și nivelul înalt al conținutului său.

Cartea abordează un front larg, începînd de la anatomie, trecînd prin zoologie și medicina clinică și ajungînd la fiziologia, farmacologia și biochimia acestor hormoni. Pentru a nu da o unitate de doctrină, în expunerea capitolelor autorii au fost lăsați să își expună punctul lor de vedere. În felul acesta sînt prezentate structura și funcțiile hipofizei, chimia hormonilor neurohipofizari, influența enzimelor asupra acestor hormoni, metodele biologice întrebuințate, determinările acestor hormoni în sînge și alte lichide biologice. În continuare sînt prezentate producția, transportul și eliminarea hormonilor, acțiunea lor circulatorie, efectele lor metabolice, influența lor asupra rinichiului și uterului, asupra funcției adenohipofizare. Se trece apoi la acțiunea și funcția hormonilor la vertebrate inferioare, la aspectele filogenetice, la antagoniștii hormonilor, la prezentarea produșilor sintetici analogi și omologi și a proprietăților lor farmacologice de bază.

Fiecare capitol are cîte o substanțială bibliografie, variind între 100 și 500 de trimiteri, iar la sfîrșitul volumului se dă cîte un index de autori și de subiecte. Cercetătorii care lucrează în acest domeniu au astfel la dispoziție întreaga bibliografie consacrată acestei probleme.

Cecilia Motaș
Institutul de biochimie al
Academiei Republicii Socialiste România

ROBLEY J. LIGHT, *A brief introduction to biochemistry* (*Scurtă introducere în biochimie*), W. A. Benjamin, Inc., New York — Amsterdam, 1968, 166 p.

Această carte face parte din seria de monografii de chimie generală, editate de Russell Johnsen de la Universitatea din Florida, unde R. J. Light este profesor de chimie.

Cartea se adresează, în egală măsură, studenților în chimie și în biologie, precum și celor interesați în domenii învecinate și care doresc să cunoască principiile de bază ale biochimiei.

În primul capitol se caracterizează, pe scurt, celula şi se discută problema unităţii vieţii şi a evoluţiei ei, ca şi locul virusurilor în natură. După autor, nu este atît de important a stabili dacă virusurile sînt sau nu vii, cît a înţelege mecanismele chimice fundamentale pe baza cărora ele acţionează.

Capitolul al 2-lea, „Cataliza", tratează, într-o primă parte, viteza de reacţie şi noţiunile de ordin de reacţie, precum şi noţiunile legate de natura catalizei enzimatice. Această parte mai cuprinde noţiuni despre coenzime şi structura proteinelor implicate în înţelegerea activităţii enzimatice. În a doua parte se tratează problema mecanismelor de acţiune a enzimelor.

Capitolul următor, unul dintre cele mai importante, se ocupă de aspectele energetice. Începînd cu noţiuni despre echilibrul chimic, se continuă cu cele de termodinamică, strict necesare înţelegerii condiţiilor de desfăşurare a reacţiilor biochimice, reacţiile de oxido-reducere, lanţul transportor de electroni şi sinteza ATF în cadrul fosforilării oxidative. Capitolul se încheie cu descrierea fotosintezei.

Metabolismul intermediar face obiectul capitolului următor, în care atenţia este concentrată asupra ciclului Krebs, glicolizei, NADPH ca sursă reducătoare în biosinteză şi asupra sintezei sterolilor.

În capitolul al 5-lea se discută, după structura acizilor nucleici şi a proteinelor, funcţiile ADN şi ale celor trei tipuri de ARN în procesul transferului de informaţie (biosinteza proteică).

Aspectele mecanismelor de reglare metabolică sînt discutate în cadrul unui capitol independent, acordîndu-se un loc special problemei inhibiţiei prin produs final şi mecanismelor de represie şi inducţie, legate de aparatul genetic. Enumerarea principalilor factori de reglare se încheie cu hormonii şi feromonii, substanţe produse la nivel individual, cu rol de reglare la nivel specific.

Volumul se încheie cu un capitol în care se enumeră problemele care nu au putut fi abordate în acest cadru, un apendix despre pH şi implicaţiile lui în biochimie şi biologie, după care urmează un glosar de termeni uzuali şi un index al termenilor folosiţi în expunere. La toate acestea mai trebuie adăugat că fiecare capitol se încheie cu un rezumat, o bibliografie de bază şi un număr de probleme.

Originalitatea iconografiei, claritatea expunerii, selecţia judicioasă şi caracterul foarte modern al materialului ales, precum şi condiţiile grafice impecabile fac din acest volum o bună reuşită editorială, ştiinţifică şi didactică.

V. Eşanu
Institutul de biologie „Tr. Săvulescu"

R. RICHTERICH, *Klinische Chemie — Theorie und Praxis* (*Chimie clinică — teorie şi practică*), Ed. S. Karger, Basel — New York, 1968, 543 p., supliment, index de subiecte şi index de autori, 82 tabele, 88 fig.

Lucrarea reprezintă un îndreptar cuprinzător şi concis în ceea ce priveşte metodica de cercetare folosită în laboratorul clinic. Autorul îşi propune să prezinte principiile teoretice, modul lor de aplicare şi folosirea rezultatelor principalelor metode chimice şi biochimice pentru determinarea indicilor biologici, în stare normală şi patologică.

În prima parte a lucrării, după o prezentare a rolului chimiei clinice, a principalelor manuale şi reviste ce tratează despre metodica de laborator, precum şi a modului cum se poate

realiza documentarea în acest domeniu, autorul definește mărimile și unitățile de măsură folosite în cadrul metodelor prezentate; sînt date cîteva elemente de statistică, se arată modul corect de obținere și de valorificare a datelor experimentale, precizia și erorile metodelor de laborator. În continuare, se dau unele indicații practice cu privire la amenajarea laboratorului, verificarea calității chimicalelor și modul de recoltare și păstrare a probelor.

În partea a doua, autorul analizează principalele metode folosite în laboratorul clinic. După cîteva generalități în legătură cu separarea materialului biologic, determinarea propriu-zisă și microanaliza, sînt prezentate pe larg principiile de bază, factorii care influențează analiza, modul de prelucrare a rezultatelor în gravimetrie, volumetrie, fotometria de absorbție și fotometria în flacără, determinările de activitate enzimatică. Pentru fiecare metodă în parte se prezintă principiile de funcționare a aparatelor și modul de lucru.

În partea a treia sînt descrise principalele metode de investigare a metabolismului apei și electroliților, a metabolismului energetic, a metabolismului lipidic, protidic, glucidic, metodele de cercetare a vitaminelor, precum și metodele de dozare a unor derivați toxici, ca, de exemplu, barbituricele.

Cercetările specifice pentru organe și țesuturi sînt analizate în partea a patra a cărții. Se dau metode specifice de cercetare: determinări fizico-chimice de ioni anorganici, dozări de activitate enzimatică, teste biologice și reacții chimice specifice diverșilor compuși proprii țesuturilor și organelor cercetate. Se analizează astfel principalele organe și țesuturi ale corpului omenesc: mușchii scheletici, inima, sistemul circulator, sistemul gastrointestinal, glandele endocrine etc.

Bibliografia indicată la sfîrșitul fiecărei părți ajută la aprofundarea materialului respectiv.

Reprezentările grafice, nomogramele, tabelele cu valorile normale și figurile din cadrul fiecărei părți sau din suplimentul ce încheie această lucrare contribuie la o mai bună înțelegere a problemelor tratate, reprezentînd în același timp un ajutor în cercetarea practică.

Datorită expunerii clare și concise a materialului, preciziei datelor experimentale, precum și varietății problemelor abordate, lucrarea reprezintă o scurtă, dar cuprinzătoare introducere în domeniul metodicii laboratorului clinic.

O. Macovschi
Institutul de biochimie al Academiei
Republicii Socialiste România

Seria *Monographs on Endocrinology* (*Monografii endocrinologice*), vol. 2: K. B. EIK-NES și E. C. HORNING, *Gas Phase Chromatography of steroids* (*Cromatografia în fază gazoasă a steroizilor*), Ed. Springer Verlag, Berlin — Heidelberg — New York, 1968, 382 p., 85 fig.

În această lucrare, autorii își propun să treacă în revistă problemele legate de separarea și determinarea hormonilor steroizi și a metaboliților lor din lichidele biologice, folosind tehnica cromatografiei în fază gazoasă.

Cromatografia de partiție gaz-lichid, inițiată în 1941, a cunoscut o largă dezvoltare, permițînd studierea compușilor organici biologic activi, cu excepția polimerilor înalți. Cu începere din anii 1959—1960, această metodă s-a aplicat și pentru separarea steroizilor.

Primul capitol al monografiei dă o privire de ansamblu asupra metodelor de analiză în fază gazoasă a hormonilor steroizi şi a metaboliţilor lor, insistînd asupra detaliilor practice privind folosirea coloanelor cromatografice, a sistemelor de detectare, a introducerii probelor.

Spre deosebire de metodele analitice clasice, tehnica cromatografiei gaz-lichid combină într-o singură operaţie etapele de separare şi determinare cantitativă a amestecurilor complexe. Etapele succesive de separare, identificare, determinare cantitativă şi analiză structurală au loc în fază gazoasă. Compoziţia şi structura steroizilor se pot determina datorită combinării cromatografiei gaz-lichid cu spectrometria de masă.

Capitolele următoare (2—5) se ocupă de aplicarea metodei cromatografice la studiul hormonilor estrogeni, a progesteronei şi steroizilor înrudiţi, a hormonilor androgeni şi corticosteroizi din diferite lichide biologice : sînge, urină, bilă, extracte tisulare.

Monografia îmbină tratarea teoretică a problemelor cu cea practică, indicînd metodele folosite de diferiţi autori pentru determinarea hormonilor steroizi. Prezentarea mai multor metode permite compararea lor sub aspectul sensibilităţii şi al preciziei determinărilor.

Lucrarea evidenţiază felul în care o metodă fizico-chimică se poate aplica cu succes în analizarea materialelor biologice, ţinînd cont de particularităţile acestora din urmă.

Lucrarea cuprinde peste 500 de indicaţii bibliografice, o clasificare a steroizilor, un indice de autori, un indice general de compuşi şi altul referitor la steroizi. Rezultatele practice sînt ilustrate în 85 de diagrame şi tabele.

Doina Cilievici
Institutul de biochimie al Academiei
Republicii Socialiste România

R. RIEGER, A. MICHAELIS, M. M. GREEN, *A glossary of genetics and cytogenetics* (*Glosar de genetică şi citogenetică*), Springer Verlag, Berlin — Heidelberg — New York, 1968, 507 p.

În ultimele două decenii a avut loc o creştere substanţială a cunoştinţelor noastre asupra principiilor şi mecanismelor eredităţii. În paralel s-a produs şi o creştere în nomenclatura tehnică şi în terminologia genetică. Scopul dicţionarului genetic este să definească această nomenclatură, procurînd astfel un material folositor atît pentru studenţi, cît şi pentru cercetători. Lucrarea cuprinde aproximativ 2 500 de termeni din diverse ramuri ale geneticii clasice şi moleculare, microbiene şi umane. Unii termeni sînt nu numai definiţi, ci şi descrişi în detaliu, uneori dîndu-se chiar informaţii experimentale. Lucrarea se încheie cu o bogată bibliografie de specialitate (circa 2 000 de indicaţii) adusă la zi. Condiţiile grafice ale dicţionarului sînt excepţionale, el cuprinzînd şi tabele, scheme, diagrame, ce completează cu succes textul.

Lucrarea umple un gol ce se resimţea şi este de un real ajutor cercetătorilor din domeniul geneticii.

Sanda Rădulescu
Institutul de biochimie al
Academiei Republicii Socialiste România

H. RAINER MAURER, *Disk-Elektrophorese, Theorie und Praxis der diskontinuierlichen Polyacrylamidgel-Elektrophorese* (*Electroforeză discontinuă în gel de poliacrilamidă, teorie și practică*), Ed. Walter de Gruyter & Co., Berlin, 1969, 221 p.

Datorită multiplelor avantaje prezentate de gelul de poliacrilamidă, ca: stabilitate și indiferență chimică, transparență perfectă, posibilitatea de a varia în limite mari dimensiunile porilor, lipsa adsorbției și electrosmozei, stabilitate față de variații de pH și temperatură, buna reproductibilitate a preparării lui ș.a., electroforeza discontinuă în gel de poliacrilamidă și-a cucerit rapid un loc de frunte printre metodele analitice utilizate în laboratoarele biochimice.

Astfel, această metodă se folosește cu succes și pe scară tot mai largă la analiza proteinelor și a enzimelor, la verificarea purității diferitelor preparate și a fracțiunilor cromatografice, la urmărirea transformărilor suferite de proteine, protide și acizi nucleici în urma acțiunii unor agenți chimici sau fizici, la separarea și identificarea cantităților infime de proteine (micrograme) marcate radioactiv, la determinarea concentrației proteice relative etc.

Bazat pe o bogată experiență personală și pe un vast material bibliografic (578 de indicații bibliografice), autorul expune în monografia sa, într-un limbaj clar și într-o formă deosebit de concisă, bazele teoretice și aspectele practice ale acestei metode.

După ce discută în capitolul I problemele teoretice legate de formarea și structura gelului de poliacrilamidă, de electroforeză în general și de electroforeză discontinuă în special, în capitolul al II-lea autorul expune pe larg, cu multe indicații practice utile (rețete și modul de preparare a soluțiilor tampon și coloranților etc.), metodica electroforezei discontinue analitice. Capitolul al III-lea este consacrat microelectroforezei discontinue, iar capitolul al IV-lea electroforezei preparative în gel de poliacrilamidă. Diferitele aplicații în analizele clinice și în biochimie sînt tratate în capitolele V și VI.

Lucrarea este ilustrată cu un număr de 85 de figuri și scheme instructive, cuprinde 15 tabele și o reprezentare schematică a fazelor ce trebuie respectate la prepararea gelului, respectiv la efectuarea electroforezei în gel, precum și a sistemelor de gel verificate și confirmate de practică ca deosebit de eficiente.

Un index al firmelor producătoare de materiale necesare pentru această metodă și un index alfabetic pe subiecte completează în mod util această monografie valoroasă.

Horst D. Schell
Institutul de biochimie al
Academiei Republicii Socialiste România

Advances in enzyme regulation (*Progrese în reglarea enzimatică*), vol. 6, sub redacția GEORGE WEBER, Pergamon Press, Londra, 1968, 517 p.

Această publicație anuală, care a ajuns la cel de-al 6-lea volum, și-a cucerit o reputație mondială bine întemeiată, datorită competenței autorilor, deci calității deosebite a materialelor prezentate, precum și datorită actualității și importanței aspectelor științifice abordate. În decursul celor 6 ani, numărul paginilor și al capitolelor a crescut progresiv, ajungînd ca în acest volum să fie de 517 pagini și 11 capitole.

Primul capitol, intitulat „Reglarea carbohidraților și metabolismul lipidic", este format din 5 articole, dintre care menționăm doar pe acela a lui G. Weber și colab., referitor la inhibiția de tip *feed-back* și reglarea metabolismului glucidic, hepatic, prin controlul activităților enzimatice.

Cel de-al doilea capitol tratează despre reglarea enzimelor la om și este format din două articole, în care se descriu rezultatele obținute prin studiul piruvatkinazei și al modificărilor de la nivelul glicogenogenezei și glicogenolizei, caracterizate prin modificarea concentrației substratelor.

Al treilea capitol, „Sterolii: mecanismul lor de acțiune", este format din două articole.

Urmează apoi capitolele: „Dezvoltarea izoenzimelor" (două articole), „Activarea și inhibiția de tip feed-back în reglarea activității enzimatice" (trei articole), în care semnalăm articolul prezentat de către D. E. Koshland Jr. referitor la controlul prin schimbări conformaționale în structura proteinelor, precum și capitolul „Reglarea dihidrofolat-reductazei" (trei articole).

Capitolul al șaptelea este consacrat unui subiect actual, și anume: „AMP ciclic și reglarea enzimatică" (cinci articole), unde amintim articolele lui E. W. Sutherland, care tratează despre rolul AMP ciclic în acțiunea hormonilor, J. H. Exton și C.R. Park despre rolul AMP ciclic în controlul metabolismului hepatic și C. R. Adelman și colab. despre activitatea adenilatkinazei în ficatul de șobolan.

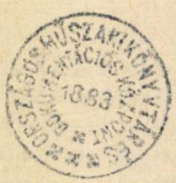
În capitolul al optulea: „Reglarea în cancer" (două articole) sînt descrise cercetări privitoare la procesele de reglare glicolitice și acțiunea polimerazei ARN în hepatoame.

Volumul se încheie cu un articol care constituie cel de al nouălea capitol, scris de către H. A. Krebs și intitulat: „Efectele etanolului asupra activităților metabolice ale ficatului".

Forma de redactare a articolelor este de cele mai multe ori în genul articolelor științifice dar rezultatele sînt analizate mai amplu și comparativ cu cele obținute de către alți cercetători în același domeniu. Fiecare articol conține o bibliografie bogată, prezintă o analiză critică a aspectelor cercetate și o metodică care de cele mai multe ori este amplu descrisă.

Toate aceste considerente fac ca această publicație periodică să se bucure de o atenție deosebită și să fie de un real folos tuturor cercetătorilor care studiază aspectele legate de reglarea activităților enzimatice și a diferitelor metabolisme.

Dinu Tănăsescu
Institutul de biochimie al
Academiei Republicii Socialiste România



„Studii şi cercetări de biochimie" publică articole originale, de nivel ştiinţific superior, din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici, ca : Viaţa ştiinţifică, în care prin scurte note, sînt aduse la cunoştinţa cititorilor unele manifestări din domeniul biochimiei : congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experienţă între cercetătorii români şi cei străini etc. Recenzii în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în ţară şi peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugaţi să redacteze lucrările cît mai concis şi să şi le structureze în: introducere, material şi metode, rezultate şi discuţii, concluzii şi rezumat. Rezumatul şi titlul lucrării vor fi traduse în limba engleză. Articolele, notele şi recenziile se vor înainta în 3 exemplare, dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuş, pe hîrtie de calc.Tabelele şi ilustraţiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planşe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea aceloraşi date în text, tabele şi grafice. Explicaţia figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de iniţială. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanţelor internaţionale.

Autorii au dreptul la un număr de 50 de extrase, gratuit.

Responsabilitatea asupra conţinutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondenţa privind manuscrisele, schimbul de publicaţii etc. se va trimite pe adresa Comitetului de redacţie : str. Docenţilor nr. 20, Bucureşti 63, Sectorul I.

LUCRARI APĂRUTE IN EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

R. PORTOCALĂ şi L. POPA, **Acizii riqonucleici celulari şi virali,** 1966, 25 × 17,50, 375 p., 8 pl., legat, anvelopă, 26 lei.

M. G. BALŞ, **Imunofluorescenţi şi aplicaţiile ei în ieframienobiologie,** 1966, 25 × 17,50, 285 p., 18 pl., legat, anvelopă, 27 lei.

ION CANTACUZINO, **Opere alese. Oeuvres choisies,** 1965, 25 × 17,50, 687 p., legat, anvelopă, 44 lei.

* * * **Omagiu acad. prof.RALUCA RIPAN,** 1966, 30,50 × 21,50 628 p. + 2 pl., legat, anvelopă, 50 lei.

La revue „Studii şi cercetări de biochimie" paraît 4 fois par an. Le prix d'un abonnement annuel est de $ 5. — FF. 25. —DM. 20. — Toute commande à l'étranger sera adressée à CARTIMEX, Boîte postale 134—135 Bucarest, Roumanie ou à ses représentants à l'étranger. En Roumanie, vous pourrez vous abonner par les bureaux de poste ou chez votre facteur.

ST. CERC. BIOCHIM., TOMUL 12, NR. 2, P. 101 — 204, BUCUREŞTI, MAI, 1969

I. P. „Informaţia" — c. 3239 | 43316 | Lei 20.—

F 1330

studii şi cercetări de biochimie

3
TOMUL 12
1969

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA
St. cerc. biochim., tomul 12, nr. 3, p. 205—300, Bucureşti, septembrie, 1969

COMITETUL DE REDACȚIE

Redactor responsabil :

ACADEMICIAN E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct :

H. SLUȘANSCHI

Membri :

S. OERIU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România ; EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România ; M. MEZINCESCU ; I. VASILESCU ; TR. RĂDULESCU ; VICTORIA ALEXANDRESCU.

Secretar de redacție :

VICTOR GHEȚIE

Revista apare de 4 ori pe an.

Prețul unui abonament anual este de 80 lei.

În țară abonamentele se fac la oficiile poștale, agențiile poștale, factorii poștali și difuzorii voluntari din întreprinderi și instituții.

Orice comandă din străinătate (numere izolate sau abonamente) se face prin CARTIMEX, Căsuța poștală 134—135, București, Republica Socialistă România, sau prin reprezentanții săi din străinătate.

Manuscrisele, cărțile și revistele pentru schimb, precum și orice corespondență se vor trimite pe adresa comitetului de redacție al revistei „Studii și cercetări de biochimie".

ADRESA REDACȚIEI :
București, str. Docenților nr. 20
Sectorul I

E 1330

ACADEMIA REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

BIOCHIMIE

Tom. 12, nr. 3 1969

SUMAR

Pag.

E. MACOVSCHI, Testarea valabilităţii teoriei biostructurii 209

V. ALEXANDRESCU, I. CĂLIN, Studiul electroforetic şi imunoelectroforetic al izoperoxidazelor din frunzele de grîu, orz, ovăz, secară şi din rădăcina de hrean 223

L. BUZILĂ, Scindarea vicilinei din sămînţa de mazăre în cursul germinaţiei 229

S. CEAUŞESCU, Acţiunea razelor ultraviolete asupra sorbţiei albastrului de toluidină de către ţesutul foliar de tomate 233

GH. FURNICĂ, V. URSU, Studiul modificărilor induse de către radiaţiile gamma în structura proteinelor şi a acizilor nucleici, cu ajutorul spectrometriei în infraroşu 239

S. GABOR, T. FRITS, B. BÖHM, A. COAŞAN, Date cu privire la activitatea reductazelor pulmonare în silicoza experimentală la şobolan 245

V. GHEŢIE, A. SULICA, Captarea şi degradarea intracelulară a imunoglobulinei G de iepure de către leucocitele polimorfonucleare izolate din lichidul peritoneal de cobai 251

Z. MARCU, I. BRAD, ŞT. NICULESCU, E. MOLDOVEANU, Diferenţieri ale spectrului izoperoxidazic în funcţie de particularităţile structurale ale donorilor 265

A. MIHĂESCU, Sorbţia albastrului de toluidină de către ţesutul foliar de tomate şi de ardei la temperaturi ridicate. 271

REFERAT GENERAL

V. BRATU, Hemoglobine şi hemoglobinopatii 275

RECENZII 289

VIAŢA ŞTIINŢIFICĂ 299

St. cerc. biochim., tomul 12, nr. 3, p. 205 — 300, Bucureşti, septembrie, 1969

ACADEMIA REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

BIOCHIMIE

Tom. 12, No. 3 1969

ORSZÁGOS MŰSZAKI KÖNYVTÁR ÉS DOKUMENTÁCIÓS KÖZPONT 1983

CONTENTS

Page.

E. MACOVSCHI, Verification of the biostructure theory validity 209

V. ALEXANDRESCU, I. CĂLIN, Electrophoretic and immunoelectrophoretic study of isoperoxydases from wheat, barley, oats, rye leaves and from horse radish root 223

L. BUZILĂ, Breakdown of vicilin in pea seeds during germination 229

S. CEAUŞESCU, Ultraviolet UV-rays action on the toluidine blue sorption by the tomato foliary tissue 233

GH. FURNICĂ, V. URSU, IR spectrophotometric study of the changes induced by gamma irradiation in the structure of proteins and nucleic acids . . . 239

S. GABOR, T. FRITS, B. BÖHM, A. COAŞAN, Some data on the pulmonary reductase activity in the experimental silicosis in rats 245

V. GHEŢIE, A. SULICA, Uptake and breakdown of rabbit immunoglobulin G by guinea pig polymorphonuclear leucocytes. 251

Z. MARCU, I. BRAD, ŞT. NICULESCU, E. MOLDOVEANU, Differentiations in isoperoxydase patterns as a function of the structural peculiarities of the donors 265

A. MIHĂESCU, Sorption of tomato and pepper leaf tissue for toluidine blue at high temperatures. 271

REVIEW

V. BRATU, Haemoglobins and haemoglobinopathies 275

BOOK REVIEWS 289

MEETINGS 299

St. cerc. biochim., tomul 12, nr. 3, p. 205 – 300, Bucureşti, septembrie, 1969

ST. CERC. BIOCHIM. 12, 3, 209–222 (1969)

TESTAREA VALABILITĂȚII TEORIEI BIOSTRUCTURII

EUGEN MACOVSCHI

Rezumat. — Valabilitatea teoriei biostructurii a fost testată atît teoretic, cît și experimental. În primul caz, testarea s-a bazat pe elaborarea unei noi teorii a permeabilității celulelor vii, precum și a premiselor unei teorii polifosfolipidice a memoriei. În cazul al doilea, existența biostructurii a fost demonstrată prin descoperirea unui fapt nou : creșterea proporției de apă liberă în țesuturile vii sub acțiunea inhibitorilor metabolici. Totodată s-a dovedit că datele experimentale obținute de alți cercetători, care au urmărit rezolvarea altor probleme, se încadrează în prevederile teoriei biostructurii.

Conform concepției moleculare, care domină biologia modernă, între materia organismelor vii și aceea a organismelor moarte nu există nici o deosebire calitativă, deoarece se consideră că atît unele, cît și celelalte ar fi alcătuite din moleculele aceloraşi substanțe. În schimb se afirmă că viața organismelor depinde de metabolism, înțelegîndu-se sub acest termen acel ansamblu de reacții biochimice extrem de precis coordonate în timp și spațiu, care se produc în protoplasma vie. La organismele moarte, această coordonare lipsește.

În ultimii ani am elaborat o nouă concepție despre alcătuirea viului, profund deosebită de concepția moleculară. Conform concepției noastre, o parte din materia cuprinsă în celulele vii este integrată într-o structură cu totul specială, care se destramă o dată cu moartea, punînd în libertate componentele din care este alcătuită. Această structură se deosebește fundamental de orice structură pe care o poate forma materia nevie; moleculele diferitelor substanțe, integrîndu-se în ea și devenind componentele ei, își modifică comportarea și prezintă însușiri noi, pe care nu le-au avut înainte de integrare; legăturile corelative care se stabilesc între componentele acestei structuri fac ca ea să apară ca un „întreg", în care o modificare provocată la nivelul uneia dintre componente influențează alte componente și se repercutează fie asupra unei porțiuni, fie asupra întregii structuri. Datorită acestui specific, materia cuprinsă în această structură se deosebește calitativ de materia nevie, iar structura ca atare, aflată în continuă transformare și evoluție, nu poate fi reprezentată prin simbolurile chimice actuale. De aceea, cercetarea ei va duce la elaborarea unei simbolistici noi, capabilă să exprime atît compoziția ei, cît și raporturile dintre componentele din care este alcătuită, precum și stările și funcțiile acestor componente.

Structura menţionată poate fi denumită *biostructură*, iar materia cuprinsă în ea — materia biostructurată.

Prin urmare, materia din organismele vii se prezintă sub două aspecte coexistente: cel biostructural, specific viului (materia vie propriu-zisă), şi cel molecular, specific neviului (materia nevie), pe cînd în organismele moarte întreaga materie se prezintă sub un singur aspect, cel molecular, specific materiei nevii.

Considerăm că viaţa este condiţionată de existenţa biostructurii şi de coexistenţa acesteia cu materia nevie a organismului, că biostructura imprimă organismelor acele însuşiri caracteristice ale căror manifestări se supun legilor biologice, şi că biostructura reprezintă principalul factor coordonator al transformărilor biochimice din organismele vii.

Din cele de mai sus rezultă că biostructura nu este reprezentată prin structura morfologică cunoscută a celulelor vii, deoarece formaţiunile intracelulare nu se destramă o dată cu moartea celulelor. De altfel, înseşi metodele de izolare a lor necesită omorîrea materialului biologic respectiv. Dacă însă se ţine seama de faptul că formaţiunile intracelulare sînt generate numai de celulele vii, în care biostructura există, se poate bănui că aceasta din urmă participă la geneza formaţiunilor amintite.

★

Concepţia despre existenţa biostructurii în protoplasma celulelor vii a fost elaborată şi publicată pentru prima dată în 1958—1959 sub forma unei simple ipoteze de lucru [1]. De atunci, atît cercetările teoretice, cît şi cele experimentale au dovedit valabilitatea acestei concepţii şi ne-au permis să demonstrăm experimental existenţa obiectivă a structurii menţionate. Pentru a permite celor interesaţi să urmărească mai uşor aceste cercetări, socotim necesar să prezentăm aici, pe scurt, motivele care au determinat conceperea lor şi planul după care ele au evoluat.

Începem prin următoarele afirmaţii, pe care le poate formula oricine care nu cunoaşte în suficientă măsură teoria noastră. Timp de multe decenii, mii de cercetători citologi, histologi, fiziologi, biochimişti şi alţii au lucrat cu material biologic, aplicînd cele mai variate şi ingenioase mijloace de investigaţie, şi totuşi nici unul nu a semnalat pînă acum prezenţa biostructurii în organismele vii. Mai mult, existenţa acestei structuri în protoplasma vie nici nu a fost măcar bănuită. Faptele acestea par elocvente şi, în lumina lor, este logic să ne întrebăm dacă nu cumva biostructura este un fel de himeră, a cărei căutare ar însemna numai o pierdere inutilă de timp? !

Dacă cercetăm însă istoria ştiinţelor, constatăm că şi alte ipoteze au fost la început în situaţie similară. Să luăm, de exemplu, cazul ipotezei moleculare în chimie. După cum se ştie, noţiunea de moleculă, ca particulă alcătuită din atomi, a fost introdusă în chimie la începutul secolului trecut. Dar, timp de multe decenii, atît înainte, cît şi după enunţarea ipotezei moleculare, mii de cercetători chimişti, fizicieni, mineralogi şi alţii au lucrat cu nenumărate substanţe, aplicînd mijloace de investigaţie tot mai perfecţionate, şi totuşi nici unul nu a semnalat prezenţa obiectivă a moleculelor în materialele cercetate. Faptul acesta părea atît de elocvent, încît nu numai imediat după enunţarea ipotezei moleculare, dar şi mult mai

tîrziu se exprimau îndoieli cu privire la posibilitatea existenței reale a moleculelor și se combătea chiar ipoteza însăși. Abia la începutul secolului nostru, existența obiectivă a moleculelor a fost demonstrată experimental.

Or, între ipoteza biostructurală, elaborată de noi în 1958 pentru interpretarea deosebirii dintre viu și neviu și pentru lămurirea fenomenelor care se produc în protoplasmă în timpul morții, și ipoteza moleculară, elaborată în jurul anului 1810 pentru interpretarea legilor de combinare chimică, există o anumită similitudine : ambele ipoteze admit existența unor formațiuni materiale — biostructura, respectiv moleculele — pe care nici pînă atunci și nici imediat după aceea nu le-a văzut și nu le-a sesizat nimeni. Cum însă, între timp, calea evolutivă parcursă de ipoteza moleculară a dus la demonstrarea existenței obiective a moleculelor, ne-am pus problema dacă nu cumva ar fi indicat ca și în cazul ipotezei biostructurale să încercăm să parcurgem același drum. Am avea următoarele avantaje : în primul rînd, cunoscînd drumul și trecînd prin aceleași etape, s-ar putea să ajungem mai repede și mai direct la țintă, adică la demonstrarea existenței obiective a biostructurii ; în al doilea rînd, date fiind similitudinea dintre natura celor două ipoteze și paralelismul dintre drumurile parcurse, dovezile ce se vor aduce în favoarea existenței biostructurii vor fi sigure, negarea valabilității lor fiind echivalentă, în fond, cu negarea existenței moleculelor.

Datorită motivelor de mai sus, am trecut la analiza evoluției ipotezei moleculare, în vederea trasării drumului de urmat în cazul ipotezei biostructurale.

Ipoteza moleculară, elaborată sub o formă apropiată de cea actuală în jurul anului 1810, datorită lucrărilor publicate de J. Dalton (1808) (ipoteza atomică), A. Avogadro (1811) (ipoteza moleculară) și alții, a început să se dezvolte, găsind tot mai multe aplicații în diferite domenii ale chimiei și fizicii. Așa, de exemplu, ea a generat teoria cinetică a gazelor, prezentată sub forma ei actuală pe la mijlocul secolului trecut de către R. Clausius (1857), J. Maxwell (1860), M. Boltzmann (1872), J. van der Waals (1873) și alții ; spre sfîrșitul aceluiași secol, tot ea a permis elaborarea teoriei combinațiilor complexe de către A. Werner (1893) etc. Astfel, dovedindu-și aplicabilitatea în diferitele domenii ale chimiei și fizicii, modesta ipoteză inițială s-a transformat cu încetul în teoria moleculară bine fundamentată. Cu toate acestea, existența obiectivă a moleculelor rămînea încă nedemonstrată experimental. Datorită acestui fapt, unii chimiști din secolul trecut și chiar de la începutul secolului nostru, ca Wilhelm Ostwald și alții, se îndoiau de valabilitatea teoriei moleculare, o ocoleau în lucrările lor și chiar o combăteau. Abia în jurul anului 1910, adică după 100 de ani de la formularea principiilor fundamentale ale ipotezei moleculare, J. Perrin (1909), cercetînd repartiția particulelor unor suspensii în funcție de înălțime, a adus prima dovadă concretă în sprijinul existenței obiective a moleculelor. Datorită acestei dovezi, precum și altora, existența moleculelor a devenit o certitudine de care nu se mai poate îndoi nimeni.

Prin urmare, valabilitatea ipotezei moleculare a fost testată întîi teoretic, prin aplicarea ei în diferite domenii ale chimiei ; aceasta a permis transformarea ipotezei menționate în teorie. Apoi, pe măsura dezvoltării

atît a teoriei moleculare, cît şi a metodelor de cercetare, s-a trecut la testarea ei experimentală.

Rezultă că şi în cazul ipotezei biostructurale am putea străbate acelaşi drum : să testăm întîi teoretic valabilitatea ei, cercetînd aplicabilitatea acestei ipoteze în diferitele domenii ale biologiei, pentru ca apoi, pe măsură ce vom reuşi să elaborăm mijloacele adecvate de investigaţie, să trecem la testarea ei experimentală.

Testarea teoretică se bazează pe faptul cunoscut că o ipoteză justă îşi găseşte aplicaţii în cele mai diferite domenii ale ştiinţei respective. Cu cît aceste domenii sînt mai multe şi mai variate, cu atît probabilitatea valabilităţii ipotezei respective este mai mare. Importanţă deosebită prezintă constatarea că astfel de aplicări ale ipotezei în diferite domenii ale ştiinţei generează, de obicei, ipoteze şi teorii noi, specifice fiecărui domeniu abordat. Aceasta demonstrează justeţea ipotezei iniţiale şi duce la transformarea ei în teorie.

Să procedăm deci la alegerea acelor domenii ale biologiei în cadrul cărora vom încerca aplicabilitatea ipotezei biostructurale. Desigur, în acest scop am putea recurge, principial, la orice domeniu care are ca obiect cercetarea proprietăţilor viului, cum sînt : excitabilitatea, imunitatea, permeabilitatea celulară, mişcarea protoplasmatică, potenţialele bioelectrice, memoria, ereditatea etc., deoarece considerăm că biostructura este „purtătoarea" tuturor acestor proprietăţi. Cum însă aplicarea ipotezei biostructurale în toate aceste domenii ar necesita mult timp, ne-am propus să recurgem deocamdată numai la două dintre ele, urmînd ca în viitor să abordăm succesiv şi pe celelalte. La întîmplare, prin tragere la sorţi, neam oprit asupra permeabilităţii celulare şi memoriei. Rezultatele obţinute s-au dovedit a fi interesante. Conform aşteptărilor, ele ne-au condus la elaborarea atît a unei teorii biostructurale a permeabilităţii celulare, cît şi a premiselor unei teorii biostructurale a memoriei. Prima a fost publicată în 1965 [2], iar cealaltă în 1966 [3] şi în 1967 [4].

Unele aspecte ale ambelor teorii şi compararea lor cu aspectele corespunzătoare ale teoriei cinetice a gazelor, respectiv ale teoriei combinaţiilor complexe, sînt prezentate în tabelele 1 şi 2.

Tabela 1

Unele paralelisme între teoria cinetică a gazelor şi teoria biostructurală a permeabilităţii celulare*

Teoria cinetică a gazelor [5]	Teoria biostructurală a permeabilităţii celulare [2]
A. Admite că gazele sînt alcătuite din molecule, care se află în continuă mişcare.	A. Admite că viul este alcătuit din biostructură şi soluţia intraplasmatică.
B. Explică presiunea şi compresibilitatea gazelor, admiţînd că moleculele în mişcarea lor lovesc pereţii vasului în care se află gazul, realizînd astfel presiunea corespunzătoare, iar distanţele dintre molecule fiind mari, comprimarea gazului duce la micşorarea acestor distanţe. Aceste consideraţii permit explicarea legii Boyle-Mariotte.	B. Explică distribuţia asimetrică a electroliţilor între celulele vii şi lichidul interstiţial, admiţînd că în celulele vii ionii de potasiu sînt în cea mai mare parte integraţi în biostructură, pe cînd marea majoritate a ionilor de sodiu se află în soluţia intraplasmatică. Aceste consideraţii permit explicarea echilibrului ionic dintre celulele vii şi lichidul interstiţial.

Tabela 1 (continuare)

Teoria cinetică a gazelor [5]	Teoria biostructurală a permeabilității celulare [2]
C. Arată că la toate gazele la aceeași temperatură moleculele au aceeași energie cinetică medie și că scăderea aportului de căldură duce la scăderea energiei cinetice a moleculelor și la modificarea (scăderea) presiunii gazelor.	C. Arată că la toate organismele energia provenită din metabolism contribuie la menținerea integrității biostructurii și că scăderea metabolismului celular duce la destrămarea parțială a biostructurii și la modificarea echilibrului ionic dintre celulele vii și lichidul interstițial.
D. Permite calculul liberului parcurs mediu, adică al distanței medii străbătute de molecula unui gaz între două ciocniri succesive ([5], p. 193), conform formulei : $$l = \frac{1}{\sqrt{2}\, A \pi \sigma^2},$$ în care : l — liberul parcurs mediu, A — numărul de molecule în cm^3 gaz, σ — diametrul moleculelor.	D. Permite calculul efluxului ionilor de sodiu din axonii vii încărcați cu sodiu radioactiv și introduși în apa de mare ([6], p. 228), conform formulei : $$E = (A-c) - 10^{\log (A-c) - Kt}$$ în care : E — eflux de gradient A — concentrația inițială a ionilor de sodiu în axoplasmă, c — concentrația ionilor de sodiu în apa de mare, K — constanta, t — timpul.
E. Demonstrează ([5], p. 181) că energia cinetică medie a unei molecule de gaz poate fi exprimată prin formula : $$\frac{1}{2} mu^2 = \frac{3}{2} kT$$ în care : m — masa unei molecule, u — viteza medie a unei molecule, k — constanta lui Boltzmann, T — temperatura absolută.	E. Demonstrează ([7], p. 129) că proporția ionilor de potasiu ce pătrund în mușchiul striat viu din lichidul de perfuzie poate fi exprimată prin formula : $$b = \frac{Q}{100} v - a$$ în care : b — cantitatea ionilor de potasiu pătrunși în mușchi, Q — cantitatea ionilor de potasiu în 100 ml lichid de perfuzie, v — cantitatea apei libere din mușchi, a — cantitatea ionilor de potasiu preexistenți în soluția intraplasmatică din mușchi.

* Aceste două teorii sînt comparate aici numai principial, ținîndu-se seama de conținutul lor. Ele nu pot fi comparate din punctul de vedere al aportului adus în știință, întrucît la dezvoltarea și aprofundarea teoriei cinetice a gazelor au contribuit timp de mai multe decenii numeroși cercetători, pe cînd teoria biostructurală a permeabilității celulelor vii a fost enunțată abia acum 4 ani.

Tabela 2

Unele paralelisme între teoria combinațiilor complexe și teoria biostructurală a memoriei*

Teoria combinațiilor complexe [8]	Teoria biostructurală a memoriei [3], [4]
A. Alcătuirea combinațiilor complexe nu putea fi explicată de pe pozițiile con-	A. Alcătuirea formațiunilor polifosfolipidice nu putea fi explicată de pe pozițiile

Tabela 2 (continuare)

Teoria combinaţiilor complexe [8]	Teoria biostructurală a memoriei [3], [4]
cepţiilor de pînă atunci despre valenţă.	concepţiei moleculare despre alcătuirea viului.
B. Admiţînd existenţa unor valenţe necunoscute pînă atunci, valenţe coordinative, s-a putut fundamenta o nouă concepţie despre alcătuirea combinaţiilor complexe, care joacă un rol important în chimia analitică şi preparativă.	B. Admiţînd existenţa unei structuri necunoscute pînă acum, biostructura, s-a putut fundamenta o nouă concepţie despre alcătuirea formaţiunilor polifosfolipido-proteo-nucleice, cărora le revine nu rol important în funcţia mnezică a celulelor nervoase.
C. Noua concepţie a permis descifrarea alcătuirii combinaţiilor complexe şi precizarea rolului fiecărei categorii de componente din aceste combinaţii.	C. Noua concepţie a permis intuirea alcătuirii formaţiunilor polifosfolipido-proteo-nucleice şi precizarea rolului mnezic al fiecărei categorii de componente din aceste formaţiuni.
D. Teoria combinaţiilor complexe a necesitat introducerea în chimie a unei serii de noţiuni şi termeni noi, ca: atom central, ligand, complex, punct coordinativ, numărul de coordinaţie, sfera interioară a combinaţiilor complexe, complecşi interni, combinaţii supracomplexe etc.	D. Teoria biostructurală a memoriei a necesitat introducerea în biologie a unei serii de noţiuni şi termeni noi, ca: polifosfolipide, componente polifosfolipidice transmiţătoare şi purtătoare, sensograme, dispozitive neuroînregistrător, neuropurtător şi neuromotor, impulsuri de înregistrare şi de reproducere etc.
E. Teoria combinaţiilor complexe a explicat: structura chimică a acestor combinaţii şi însuşirile lor chimice şi fizice, diferitele categorii de izomeriocare se întîlnesc la complecşi, ca izomeria geometrică, optică, salină, de coordinaţie, de valenţă, şi altele.	E. Teoria biostructurală a memoriei a explicat: alcătuirea şi funcţionarea dispozitivelor neuroînregistrător, neuropurtător şi neuromotor, apariţia anumitor stări şi fenomene psihice, ca stările de hipo- şi hiperestezie, apariţia amintirilor, manifestarea iluziilor şi halucinaţiilor, mecanismul diferitelor categorii de amnezii (anterograde, retrograde, anormale, neurologice, de evocare şi de fixare), de asemenea a permis interpretarea acţiunii diferitelor substanţe psihotrope etc.

* Aceste două teorii sînt comparate aici numai principial, ţinîndu-se seama de conţinutul l or. Ele nu pot fi comparate din punctul de vedere al aportului adus în ştiinţă, întrucît la dezvoltarea şi aprofundarea teoriei combinaţiilor complexe au contribuit timp de mai multe decenii numeroşi cercetători, pe cînd teoria biostructurală a memoriei a fost enunţată abia acum 3 ani.

Constatăm deci că ipoteza biostructurală îşi găseşte aplicabilitatea în diferite domenii ale biologiei şi permite elaborarea de noi teorii specifice domeniilor respective. Înseamnă că testarea teoretică a valabilităţii ipotezei biostructurale s-a soldat cu un rezultat pozitiv, ceea ce justifică trecerea acestei ipoteze în categoria teoriilor.

Testarea experimentală a valabilităţii ipotezei biostructurale ridică două probleme.

Prima problemă priveşte cercetările experimentale efectuate pe material viu şi publicate de diferiţi autori. Aceste cercetări impun următoarea întrebare firească: dacă biostructura există, atunci de ce prezenţa ei în materialul biologic cercetat nu a fost încă sesizată? Doar este greu de admis ca existenţa acestei structuri, specifică viului, să nu se fi oglindit

într-un fel sau altul în rezultatele numeroaselor cercetări efectuate pînă acum. Răspunsul este lesne de dat : convinși de aplicabilitatea universală în biologie a concepției moleculare și nebănuind existența biostructurii, cercetătorii își interpretau rezultatele experimentale de pe pozițiile concepției menționate și unanim admise ; astfel, ajungeau la concluzii a căror justețe li se părea asigurată. Tocmai datorită acestei împrejurări, unele rezultate nu tocmai concordante cu cerințele concepției moleculare au fost cîteodată trecute cu vederea sau semnalate fără a li se da vreo explicație ; se mai întîmpla că ele erau interpretate astfel, încît să li se asigure concordanța cu concepția moleculară sau se foloseau ca bază pentru enunțarea de ipoteze noi, dar de asemenea încadrabile în această concepție.

Dacă răspunsul la întrebarea de mai sus și concluziile respective sînt bune, consecințele care se desprind din ele prezintă o importanță deosebită. Într-adevăr, ele arată că revizuirea de pe pozițiile teoriei biostructurii a multor lucrări publicate pînă acum va permite, eventual :

— valorificarea dintr-un nou punct de vedere a rezultatelor experimentale obținute de autorii acestor lucrări ;

— formularea unor noi concluzii, la care autorii lucrărilor respective nici nu s-au gîndit ;

— confirmarea existenței biostructurii pe baza cercetărilor experimentale efectuate cu totul în alt scop.

Se înțelege că în cadrul acestei revizuiri vor trebui luate în considerare, în primul rînd, rezultatele experimentale publicate de autorii lucrărilor respective, și nu concluziile la care ei au ajuns pe baza concepției moleculare.

Pentru verificarea acestei supoziții, ne-am propus să revizuim în sensul arătat două lucrări luate la întîmplare din literatura de specialitate, și anume : lucrarea *Über die Ionenpermeabilität des quergestreiften Muskels*, publicată de R. Mond și K. Amson în 1928 [9], și lucrarea *Active transport of cations in giant axons from Sepia and Loligo*, publicată de A.L. Hodgkin și R.D. Keynes în 1955 [10]. Revizuirea respectivă, precum și noile concluzii care se desprind din datele experimentale obținute de autorii acestor două lucrări au format obiectul lucrărilor noastre publicate în 1966 [7] și în 1968 [6]. Aici prezentăm în tabelele 3 și 4 numai unele concluzii noi bazate pe teoria biostructurii, care se desprind din datele experimentale obținute de autorii celor două lucrări, precum și concluziile la care autorii menționați au ajuns pe baza teoriei membranei.

Tabela 3

Unele concluzii care se desprind în urma examinării prin prismele teoriei membranei și teoriei biostructurii a datelor experimentale obținute de R. Mond și K. Amson (9) prin cercetarea permeabilității mușchiului striat de broască pentru ionii de potasiu

Teoria membranei [9]	Teoria biostructurii [7]
A. Concentrația ionilor de potasiu în mușchi, definită prin raportul dintre cantitatea ionilor de potasiu în mușchi și cantitatea apei din mioplasmă, ar fi de 324 mg% ([7], p. 126, resp. 172).	A. Concentrația ionilor de potasiu în mușchi, definită prin raportul dintre cantitatea ionilor de potasiu dizolvați în apa liberă musculară (soluția intraplasmatică) și cantitatea acestei ape, este de 14 mg% ([7], p. 131, resp. 177). (Restul potasiului este cuprins în biostructură.)

Tabela 3 (continuare)

Teoria membranei [9]	Teoria biostructurii [7]
B. Se constată experimental că, în cazul cînd concentrația ionilor de potasiu în lichidul de perfuzie este de aproximativ 13 mg%, concentrația acestei soluții nu se modifică în cursul perfuziei, deși, după teoria membranei, această concentrație ar fi incomparabil mai mică decît cea din mușchi (324 mg%). Teoria membranei *nu poate explica* cauza acestui „prag de potasiu", descoperit de R. Mond și K. Amson.	B. Se constată experimental că, în cazul cînd concentrația ionilor de potasiu în lichidul de perfuzie este de aproximativ 13 mg%, concentrația acestei soluții nu se modifică în cursul perfuziei. Conform teoriei biostructurii, faptul acesta se datorește egalității concentrațiilor ionilor de potasiu în mediile intra- și extramuscular (14 mg%, respectiv 13 mg%). Astfel teoria biostructurii *arată limpede cauza* „pragului de potasiu".
C. În cazul cînd concentrația ionilor de potasiu în lichidul de perfuzie depășește 13 mg% (de exx.: 32 mg%), ionii aceștia pătrund din lichid în mușchi. Admițînd că în mușchi concentrația lor ar fi de 324 mg%, teoria membranei duce la concluzia că potasiul ar pătrunde în mușchi *împotriva* gradientului de concentrație.	C. În cazul cînd concentrația ionilor de potasiu în lichidul de perfuzie depășește valoarea de 13 mg% (de ex.: 32 mg%), ionii de potasiu pătrund în mușchi. Cum, după teoria biostructurii, concentrația acestor ioni în mușchi este de numai 14 mg%, înseamnă că în cazul de față potasiul pătrunde în mușchi *conform* gradientului de concentrație.
D. Dat fiind că, după teoria membranei, pătrunderea ionilor de potasiu în mușchi (în cazul de la pct. C) s-ar face împotriva gradientului de concentrație, R. Mond și K. Amson au încercat să explice fenomenul admițînd o *ipoteză suplimentară*: schimbul ionilor de potasiu ar fi însoțit de un schimb corespunzător al ionilor de hidrogen și de amoniu rezultați din metabolism (pe atunci ipoteza „pompei de sodiu" încă nu era cunoscută).	D. Dat fiind că, după teoria biostructurii, pătrunderea ionilor de potasiu în mușchi (în cazul de la pct. C) se face conform gradientului de concentrație, *nu este necesar să se recurgă la vreo ipoteză suplimentară* pentru justificarea fenomenului menționat.
E. Teoria membranei *nu a permis* valorificarea cantitativă a datelor experimentale obținute de R. Mond și K. Amson [9].	E. Teoria biostructurii *a permis* valorificarea cantitativă a datelor experimentale obținute de R. Mond și K. Amson [7].

Tabela 4

Unele concluzii care se desprind în urma examinării prin prisma teoriei membranei și teoriei biostructurii a datelor experimentale obținute de A. L. Hodgkin și R. D. Keynes [10] prin cercetarea efluxului ionilor de sodiu din axonii giganți de *Sepia* încărcați cu sodiu radioactiv și introduși apoi în apa de mare.

Teoria membranei [10]	Teoria biostructurii [6]
A. Întreaga cantitate a ionilor de sodiu din axonii vii ar fi dizolvată în axoplasmă.	A. Marea majoritate a ionilor de sodiu este dizolvată în apa liberă a axoplasmei (soluția intraplasmatică) și numai o mică parte este integrată în biostructură.
B. Concentrația ionilor de sodiu în axoplasma axonilor vii ar fi de 40 mM/l, adică ar fi *mult mai mică* decît în apa de mare (486 mM/l).	B. Concentrația ionilor de sodiu în apa liberă a axoplasmei axonilor vii (soluția intraplasmatică) este de 486 mM/l, fiind deci *egală* cu aceea din apa de mare (486 mM/l).

Tabela 4 (continuare)

Teoria membranei [10]	Teoria biostructurii [6]
C. Încărcarea axonilor vii cu sodiu radioactiv ar fi consecința modificărilor permeabilității membranelor acestora sub acțiunea curentului electric stimulator.	C. Încărcarea axonilor vii cu sodiu radioactiv este consecința destrămării parțiale și reversibile a biostructurii axoplasmei, sub acțiunea curentului electric stimulator.
D. Concentrația ionilor de sodiu în axoplasma axonilor vii încărcați cu sodiu radioactiv prin stimulare electrică ar fi de 82 mM/l, adică ar fi mult *mai mică* decît în apa de mare (486 mM/l).	D. Concentrația ionilor de sodiu în apa liberă a axoplasmei axonilor vii încărcați cu sodiu radioactiv prin stimulare electrică este de 996 mM/l, adică mult *mai mare* decît apa de mare (486 mM/l).
E. Efluxul de sodiu din axonii vii încărcați cu sodiu radioactiv și introduși în apa de mare s-ar produce *împotriva gradientului de concentrație* al acestor ioni între axoplasmă (82 mM/l) și apa de mare (486 mM/l) și ar fi un fenomen datorat activității „pompei de sodiu". Legea efluxului respectiv nu a fost stabilită.	E. Efluxul de sodiu din axonii vii încărcați cu sodiu radioactiv și introduși în apa de mare se produce *conform gradientului de concentrație* al acestor ioni între apa liberă a axoplasmei (soluția intraplasmatică) (996 mM/l) și apa de mare (486 mM/l) și este un fenomen de difuzie care urmează legea lui Fick.
F. Energia provenită din metabolism ar menține în funcție „pompa de sodiu", care ar fi localizată în membranele celulare ale axonilor vii, și astfel ar asigura concentrația scăzută a ionilor de sodiu în axoplasmă în comparație cu aceea din apa de mare.	F. Energia provenită din metabolism menține integritatea și funcțiile biostructurii din axoplasma axonilor vii și astfel asigură egalitatea concentrației ionilor de sodiu în apa liberă a axoplasmei cu aceea din apa de mare.

Constatăm deci că, în conformitate cu prevederile făcute, ipoteza biostructurală permite valorificarea dintr-un nou punct de vedere a rezultatelor experimentale obținute de diferiți autori și formularea de noi concluzii, ceea ce vine în sprijinul acestei ipoteze și justifică trecerea ei în categoria teoriilor.

Problema a doua privește elaborarea unui model experimental adecvat, capabil să permită verificarea valabilității ipotezei biostructurale prin cercetări experimentale directe.

Dată fiind similitudinea conținutului celor două ipoteze: moleculară și biostructurală, am socotit că ar fi util să luăm în considerare tocmai acel model experimental cu ajutorul căruia, acum 60 de ani, J. Perrin a demonstrat existența obiectivă a moleculelor. Firește, acest model chimic nu va putea fi folosit de noi ca atare, deoarece a fost elaborat în domeniul altor științe (chimia și fizica) și folosit pentru rezolvarea unei probleme fundamentale pentru fizică și chimie. Dar examinarea modului cum el a fost elaborat și folosit ne-ar putea da indicații cu privire la modul cum ar trebui să procedăm ca să elaborăm și să folosim un model biologic corespunzător, necesar rezolvării unei probleme similare în biologie.

Pentru aceasta era necesar :

— să prezentăm modelul chimic sub o formă care să permită analiza lui ;

— să debarasăm acest model de partea lui experimentală corespunzătoare ipotezei moleculare, ca să degajăm principiul pe care este bazat ;

— să adaptăm principiul modelului chimic la condițiile ipotezei biostructurale ;

— să suprapunem peste principiul astfel adaptat partea experimentală corespunzătoare acestei ipoteze.

Astfel vom ajunge la acel model biologic de care avem nevoie pentru a demonstra existența biostructurii.

Să începem deci cu prezentarea adecvată a modelului experimental imaginat de J. Perrin.

Pe baza teoriei cinetice, rezultată din aplicarea la gaze a ipotezei moleculare, s-a dedus legea scăderii densității și deci a desimii moleculelor unui gaz în funcție de înălțime. Or, dacă moleculele există cu adevărat, ar fi de așteptat ca și desimea particulelor unei suspensii să scadă în funcție de înălțime, conform aceleiași legi. Cercetările efectuate la microscop au verificat în mod strălucit această prevedere și astfel au demonstrat că moleculele există.

Aceasta înseamnă că, pe baza unei concepții teoretice (ipoteza moleculară), s-a prevăzut un fapt necunoscut pînă atunci (repartiția neuniformă și permanentă în cîmpul gravitațional a particulelor unei suspensii) și care nu putea fi prevăzut dacă nu era concepția teoretică respectivă. Apoi, pentru descoperirea acestui fapt s-a recurs la o metodă experimentală adecvată (metoda microscopică). Cercetările efectuate cu ajutorul ei au confirmat realitatea faptului prevăzut. Concluzia: concepția teoretică (ipoteza moleculară) este justă (deci moleculele există cu adevărat).

Prin urmare, și în cazul nostru ar trebui ca noua concepție teoretică (ipoteza biostructurală) să ne permită să prevedem un fapt încă necunoscut (faptul X) și neprevizibil pe baza concepțiilor actuale despre alcătuirea viului. Pentru descoperirea acestui fapt ar trebui să recurgem la o metodă experimentală adecvată (metoda X). Dacă cercetările efectuate cu ajutorul acestei metode vor confirma realitatea faptului X, vom putea trage concluzia că concepția teoretică (ipoteza biostructurală) este justă (deci biostructura există).

Printre diferite fapte încă necunoscute care pot fi prevăzute pe baza ipotezei biostructurale, dar sînt de neprevăzut de pe pozițiile concepției moleculare actuale, s-ar putea lua în considerare pentru testare „creșterea proporției apei libere în țesuturile vii în prezența inhibitorilor metabolici" (faptul X). Într-adevăr, teoria noastră prevede că existența biostructurii, alcătuită din apă și diferite alte substanțe, necesită un aport de energie [2], [11]. Ar fi deci de așteptat ca inhibarea parțială a biochimismului celular și deci reducerea concomitentă a producerii de energie să ducă la destrămarea parțială a biostructurii și la eliberarea unei părți a apei cuprinse în ea [2]. Prin urmare, țesuturile vii, tratate cu inhibitori metabolici, ca dinitrofenol, azidă de sodiu, arsenit de sodiu și alte substanțe de acest gen, ar trebui să conțină mai multă apă „liberă" decît țesuturile-martor. Pentru verificarea realității acestei supoziții s-ar putea recurge la metoda stoarcerii apei libere din țesuturile vii în anumite condiții experimentale (metoda X).

Astfel, prin precizarea „faptului încă necunoscut" și indicarea metodei experimentale corespunzătoare de cercetare, modelul biologic s-a concretizat și ne-a deschis calea spre verificarea directă a valabilității ipotezei biostructurale.

Primele cercetări efectuate pe material vegetal și publicate în 1969 [12] s-au dovedit concordante cu aceste premise teoretice. Într-adevăr, se știe că frunzele proaspete dau prin stoarcere sucul vacuolar și că reziduul dă sucul plasmatic, dacă înainte de stoarcere este omorît prin înghețare. Spre deosebire de alți autori [13], [14], considerăm că sucul plasmatic este alcătuit din apă și substanțe hidrosolubile provenite din biostructura care a existat în reziduul proaspăt, încă viu, dar s-a destrămat o dată cu omorîrea acestuia [15]. Or, dacă în doze nemortale inhibitorii metabolici provoacă destrămarea parțială a biostructurii, ar fi de așteptat ca frunzele tratate cu acești inhibitori să dea mai mult suc cu o cantitate mai mare de substanțe hidrosolubile decît frunzele-martor netratate cu inhibitori, deoarece la sucul vacuolar al frunzelor tratate s-ar adăuga o parte din apă și substanțe hidrosolubile provenite din biostructura parțial destrămată. Cercetările efectuate pe frunzele de porumb au confirmat întru totul aceste prevederi, ceea ce demonstrează existența biostructurii în protoplasma celulelor frunzelor vii și confirmă necesitatea unui aport de energie metabolică pentru menținerea integrității ei [12].

Cele de mai sus constituie numai unul din aspectele cercetărilor care pot fi efectuate conform modelului experimental menționat. Celălalt aspect se referă la lucrările efectuate de diferiți autori și publicate în literatura de specialitate, în cadrul cărora s-a cercetat acțiunea inhibitorilor metabolici asupra țesuturilor vii. Dacă „faptul încă necunoscut" relatat mai sus este real, ar trebui ca și rezultatele acestor cercetări să fie încadrabile în modelul experimental elaborat de noi, permițînd calculul cantității de apă care devine liberă în țesuturile supuse acțiunii inhibitorilor metabolici. Pentru a da un exemplu concret, am examinat din acest punct de vedere acea parte a lucrării *Active transport of cations in giant axons from Sepia and Loligo* de A.L. Hodgkin și R.D. Keynes din 1955 [10] care se referă la efectele inhibitorilor metabolici în axonii vii. Rezultatul acestei analize l-am publicat în 1969 [16].

Într-adevăr, cercetînd efluxul ionilor de sodiu din axonii giganți de *Sepia* încărcați întîi cu sodiu radioactiv și introduși apoi în apa de mare, autorii menționați au constatat că sub acțiunea inhibitorilor metabolici intensitatea acestui eflux scade, dar revine la normal după îndepărtarea inhibitorilor din axoni. Bazați pe teoria membranei (concepția moleculară), ei au interpretat fenomenul acesta admițînd că sub influența inhibitorilor metabolici ar scădea activitatea pompei de sodiu, ceea ce ar duce la micșorarea efluxului menționat. Or, teoria biostructurii nu numai că dă o altă interpretare, mai firească, fenomenului descoperit de A.L. Hodgkin și R.D. Keynes, dar ne-a permis să calculăm, pe baza datelor experimentale publicate de acești autori, atît modificările concentrației ionilor de sodiu în axon, care se produc sub influența dinitrofenolului, cît și cantitatea apei care se eliberează din biostructura axoplasmei datorită acestui inhibitor. Aceste rezultate, ca și cele obținute de noi prin tratarea frunzelor de porumb cu inhibitori metabolici, demonstrează existența biostructurii în axoplasma vie și confirmă necesitatea unui aport de energie pentru menținerea integrității ei. Totodată, ele arată că destrămarea parțială a biostructurii, provocată de inhibitorii metabolici, este reversibilă.

Din cele expuse rezultă că, urmînd calea parcursă de concepția moleculară de la enunțarea ei sub formă de ipoteză și pînă la demonstra-

rea existenței obiective a moleculelor, concepția biostructurală a trecut și ea prin fazele de ipoteză și apoi de teorie, pînă s-au putut aduce fapte experimentale noi care au dovedit existența obiectivă a biostructurii. Tabela 5 prezintă sumar și comparativ evoluția celor două concepții, scoțînd în evidență paralelismul drumurilor pe care le-au parcurs.

Tabela 5

Evoluția concepției moleculare în chimie și a concepției biostructurale în biologie

Concepția moleculară	Concepția biostructurală
Faza inițială	
1808 Ipoteza atomică	1958
1811 Ipoteza moleculară	1959 Ipoteza biostructurală [1]
Au fost elaborate pentru explicarea legilor transformărilor chimice	A fost elaborată pentru explicarea deosebirii dintre viu și neviu
Testarea teoretică	
Noile teorii bazate pe cele două concepții (exemple)	
După	
1857 A. Teoria cinetică a gazelor	1965 A. Teoria biostructurală a permeabilității celulelor vii [2]
1893 B. Teoria coordinației sau teoria combinațiilor complexe	1966 B. Teoria biostructurală a memoriei sau teoria formațiunilor polifosfolipidice [3]
Testarea experimentală	
Prima dovadă experimentală a existenței obiective a moleculelor	Prima dovadă experimentală a existenței obiective a biostructurii
1909 Cercetarea suspensiilor de gummigut	1969 Cercetarea eliberării apei în țesuturile vii sub acțiunea inhibitorilor metabolici [12], [16]

Evoluția lucrărilor experimentale în domeniul concepției biostructurale a fost prezentată aici numai în linii mari. De aceea, menționăm că, în afara lucrărilor la care ne-am referit, au mai fost publicate și altele.

Astfel, pe lîngă teoria biostructurală a permeabilității celulare [2] și teoria biostructurală a memoriei [3], au fost elaborate mai multe ipoteze care, de asemenea, demonstrează aplicabilitatea concepției biostructurale în cele mai diferite domenii ale biologiei, deschizînd perspectiva unor noi cercetări experimentale în domeniile respective. Printre asemenea ipoteze menționăm :

— ipoteza cu privire la interacțiuni între biostructură, enzime și medicamente [17];

— ipoteza intervenției mecanismelor de reglare cuprinse în biostructură, ca răspuns la acțiunea noxelor și medicamentelor; această ipoteză permite elaborarea unei noi concepții cu privire la rolul biostructurii în problemele de farmacodinamie, cu precizarea bazelor teoretice ale alo- și homeopatiei [18];

— ipoteza „complecșilor asimilați", care, împreună cu ipoteza cunoscută a „receptorilor hormonali", permite intuirea unui mecanism de acțiune a hormonilor în care biostructurii îi revine un rol important [19];

— ipoteza cu privire la participarea biostructurii în procesul de geneză a formațiunilor intracelulare, ca ribozomi, polizomi, lizozomi etc. [20].

Au fost aprofundate unele aspecte privind rolul biostructurii în hibridarea plantelor [21], particularitățile acestei structuri, precum și mecanismele de reglare cuprinse în ea [11], [22]. S-a cercetat modul cum biostructura din țesutul foliar al plantelor răspunde prin destrămarea parțială la acțiunea atît a razelor ultraviolete [23], cît și a temperaturilor ridicate [24].

În fine, în ultimul timp s-a trecut la cercetarea compoziției biostructurii, stabilindu-se, de exemplu, că ea cuprinde, sub forma de componente, o însemnată cantitate de apă [15], ioni de potasiu și calciu [25], ioni de fosfați, fosfatază acidă [26], ribonucleaze [27], zaharuri reducătoare [28], acizi nucleici [29] etc.

Expunerea detaliată a teoriei noastre și a întregului ansamblu de cercetări efectuate pînă acum va forma obiectul unei cărți intitulate *Biostructura*, care urmează să apară curînd.

Prezentată la redacție la 28 aprilie 1969

Institutul de biochimie al Academiei Republicii Socialiste România și Catedra de biochimie a Universității București

BIBLIOGRAFIE

1. E. Macovschi, Contemporanul, *34*, 1 (1958); Rev. de Chimie, **4**, 11 (1959).
2. E. Macovschi, St. cerc. biochim., **8**, 371 (1965); Rev. roum. Biochim., **2**, 287 (1965).
3. E. Macovschi, St. cerc. biochim., **9**, 231 (1966); Rev. roum. Biochim., **3**, 249 (1966).
4. E. Macovschi, St. cerc. biochim., **10**, 3 (1967); Rev. roum. Biochim., **4**, 17 (1967).
5. R. Brdička, *Grundlegen der Physikalischen Chemie*, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, 3 Auflage, Berlin, 1962.
6. E. Macovschi, St. cerc. biochim., **11**, 213 (1968).
7. E. Macovschi, St. cerc. biochim., **9**, 123 (1966); Rev. roum.Biochim., **3**, 169 (1966).
8. A.A. Grinberg, *Introducere în chimia combinațiilor complexe* (traducere din limba rusă), Edit. tehnică, București, 1957.
9. R. Mond, K. Amson, Pflügers Arch. ges. Physiol., **220**, 69 (1928).
10. A.L. Hodgkin, R.D. Keynes, J. Physiol., Lond., **128**, 28 (1955).
11. E. Macovschi, St. cerc. biochim., **8**, 253 (1965); Rev. roum. Biochim., **2**, 189 (1965).
12. E. Macovschi, V. Frunzeti, St. cerc. biochim., **12**, 19 (1969).
13. T. Mason, E. Phillis, Ann. Bot. N.S., **3**, 531 (1939).
14. J.A. Medvedev și colab., Biohimia, **24**, 709 (1959) și **25**, 1001 (1960).
15. E. Macovschi, I. Marineanu, Rev. roum. Biochim., **4**, 235 (1967).
16. E. Macovschi, St. cerc. biochim., **12**, 5 (1969).
17. E. Macovschi, St. cerc. biochim., **9**, 3 (1966); Rev. roum. Biochim., **3**, 321 (1966).
18. E. Macovschi, Rev. roum. Biochim., **5**, 3 (1968).
19. E. Macovschi, Rev. roum. Biochim., **5**, 253 (1966).
20. E. Macovschi, Rev. roum. Biochim., **6**, 3 (1969).
21. E. Macovschi, St. cerc. biochim., **6**, 467 (1963).
22. E. Macovschi, St. cerc. biochim., **7**, 5 (1964); Rev. roum. Biochim., **1**, 5 (1964).
23. E. Macovschi, S. Ceaușescu, St. cerc. biochim., **11**, 331 (1968).
24. E. Macovschi, A. Mihăescu, St. cerc. biochim., **11**, 337 (1968).
25. E. Macovschi, I. Marineanu, Rev. roum. Biochim., **5**, 257 (1968).
26. E. Macovschi, V. Frunzeti, Rev. roum. Biochim., **5**, 165 (1968).

27. E. Macovschi, V. Frunzeti, St. cerc. biochim., **12**, 105 (1969).
28. E. Macovschi, C. Mușolan, Rev. roum. Biochim., **6**, 89 (1969).
29. E. Macovschi, C. Mușolan, St. cerc. biochim., **13**, (1970).

VERIFICATION OF THE BIOSTRUCTURE THEORY VALIDITY

SUMMARY

The validity of the biostructure theory was both theoretically and experimentally checked. In the first case, the test was based on the elaboration of a new theory of living cell permeability as well as of a polyphospholipid theory of memory. In the second case, biostructure existence was demonstrated by the discovery of a new fact : the increase in free water ratio of living tissues under the action of metabolic inhibitors. At the same time, some experimental data obtained by other research workers in their attempts to solve other problems fit well with the predictions of biostructure theory.

CERC.BIOCHIM., 12, 3, 223–228 (1969)

STUDIUL ELECTROFORETIC ŞI IMUNOELECTROFORETIC AL IZOPEROXIDAZELOR DIN FRUNZELE DE GRÎU, ORZ, OVĂZ, SECARĂ ŞI DIN RĂDĂCINA DE HREAN

VICTORIA ALEXANDRESCU şi IOANA CĂLIN

Rezumat. — Prin microelectroforeză în gel de agar am evidenţiat la frunzele de orz 7, la grîu şi ovăz 6, iar la secară 5 fracţiuni peroxidazice ; peroxidaza din rădăcina de hrean s-a separat în 7 fracţiuni.

Imunoenzimogramele preparatelor proteice din frunzele cerealelor de mai sus, obţinute cu un ser imun antifrunză totală de porumb, evidenţiază 2 linii de precipitare cu activitate peroxidazică situate spre catod ; fracţiunile dinspre anod nu dau reacţie de precipitare. Izoperoxidazele din hrean dau 5 linii de precipitare, care cuprind toate fracţiunile.

Rezultatele obţinute arată existenţa la aceste cereale a cel puţin trei grupe de izoperoxidaze, după grupările determinante pe care le conţin : una identică cu cea din porumb, a doua cu o identitate parţială cu cea din porumb şi a treia pentru care serul imun folosit de noi nu conţine anticorpi.

Într-o lucrare anterioară [1] cu privire la izoperoxidazele din seminţele şi frunza de porumb (*Zea mays*) ne-am servit, între altele, de un ser imun antifrunză. Dispunînd de acest ser, ni s-a părut interesant să urmărim, în continuare, cum anume se comportă faţă de anticorpii prezenţi în el peroxidazele din frunza altor cereale (grîu, orz, ovăz şi secară), precum şi cele din rădăcina de hrean. Această comparare a peroxidazelor prin grupările determinante (comune sau diferite) pe care le conţin poate aduce anumite indicii noi în diferenţierea lor ca izoenzime. Paralel am urmărit şi separarea electroforetică în fracţiuni a izoperoxidazelor, pentru a putea localiza liniile de precipitare. În literatură am găsit date privind separarea electroforetică a peroxidazelor din orz [2], [3] şi hrean [4], [5], [6], dar ele au fost obţinute în condiţii diferite de ale noastre.

MATERIAL ŞI METODE

Am lucrat cu preparate proteice liofilizate din frunze de grîu (*Triticum aestivum*), orz (*Hordeum vulgare*), ovăz (*Avena sativa*), secară (*Secale cereale*) la 10–11 zile de la răsărire şi cu un preparat pur (Koch-Light) liofilizat de peroxidază din rădăcină de hrean (*Armoracia usticana*).

Extracţia proteinelor s-a efectuat cu soluţie tampon de acid boric-borax pH = 8,2, cu adăugarea unui volum egal de soluţie de clorură de

sodiu 15%. Delipidarea extractelor s-a făcut cu butanol vol/vol, iar după dializă faţă de apă distilată s-au liofilizat. Electroforeza s-a făcut în gel de agar, în soluţie tampon de acid boric-borax pH = 8,2, pe plăci mici de 2,5 . 7,5 cm, la 200 V, 1 mA/cm, timp de 1 oră şi 15 min pentru preparatele proteice din frunze şi 2 ore şi 15 min pentru preparatul din hrean.

Evidenţierea activităţii peroxidazice s-a făcut cu o soluţie saturată de guaiacol în tampon acid acetic-acetat de sodiu pH = 5 şi apă oxigenată 0,1%.

S-a folosit un ser imun antiproteină totală delipidată din frunze de porumb în etapa de plantă cu 3—4 frunze, obţinut în modul descris anterior [7].

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Izoperoxidazele din frunzele unor cereale păioase. Preparatele proteice totale din frunzele cerealelor păioase, supuse electroforezei, evidenţiază la orz 7, la grîu şi ovăz 6, iar la secară 5 fracţiuni peroxidazice. Dintre acestea, de la start spre anod se formează în cazul grîului şi secarei 2 fracţiuni, iar în cazul orzului şi ovăzului 3 fracţiuni, restul fiind localizate de la start spre catod (fig. 1). Fracţiuni electropozitive în comparaţie cu migrarea în paralel a amidonului avem doar una la ovăz şi secară şi 2 la grîu şi orz. Mobilităţile electroforetice ale acestor fracţiuni peroxidazice sînt date în tabelă.

Tabela 1

Mobilitatea electroforetică a fracţiunilor izoperoxidazice din frunzele citorva cereale şi din rădăcini de hrean

Grîu		Orz		Ovăz		Secară		Hrean	
fracţiunea	mobilitatea 10^{-5} cm²/s/V	fracţiunea	mobilitatea 10^{-5} cm²/s/V	fracţiunea	mobilitatea 10^{-5} cm²/s/V	fracţiunea	mobilitatea 10^{-5} cm²/s/V	fracţiunea	mobilitatea 10^{-5} cm²/s/V
1	1,02	1	1,10	1	1,10	1	1,05	1	1,14
2	0,87	2	0,95	2	0,85	2	0,90	2	0,98
3	0,45	3	0,82	3	0,75	3	0,25	3	0,87
4	0,25	4	0,45	4	0,27	4	0,05	4	0,69
5	−0,10	5	0,15	5	0,15	5	−0,30	5	0,50
6	−0,35	6	−0,22	6	−0,20			6	0,20
		7	−0,40					7	−0,02

Imunoenzimogramele preparatelor proteice din frunzele acestor cereale păioase cu serul imun antifrunză totală de porumb evidenţiază 2 linii de precipitare, situate în toate cazurile de la start spre catod. Prima linie de precipitare cu activitate peroxidazică cuprinde totdeauna 2 fracţiuni peroxidazice, iar a doua o fracţiune în cazul ovăzului şi al secarei şi 2 în cazul grîului şi al orzului. Aceste linii arată, în cazul grîului, o identitate totală a antigenelor (fig. 1, *b*), iar la celelalte cereale o identitate parţială (fig. 1, *d*, *f*, *h*). De la start spre anod, regiune în care avem o activitate peroxidazică destul de marcantă, nu se obţin linii de precipitare

cu activitate peroxidazică, ceea ce arată fie că speciile moleculare ale peroxidazelor din această regiune nu au corespondentul în anticorpi în antiserul folosit de noi, fie că nu conțin grupări determinante.

Ne-am pus problema dacă, totuși, în partea de la start spre anod nu există chiar în urme molecule de peroxidază care să poată precipita cu anticorpii antiserului nostru. De aceea, pentru concentrarea lor după electroforeză am eluat fracțiunile de la start spre anod separat de cele de la start spre catod, le-am liofilizat și am efectuat reacția de precipitare prin tehnica Ouchterlony. Nici în aceste condiții, pentru fracțiunile dinspre anod nu s-au obținut linii de precipitare cu activitate peroxidazică, pe cînd eluatul fracțiunilor dinspre catod determină apariția acelorași linii de precipitare ca și preparatul total.

În lucrarea privind studiul izoperoxidazelor din porumb am constatat că peroxidazele din frunzele de porumb se separă prin electroforeza în gel de agar în 7 fracțiuni (fig. 1, *i*). Pentru fracțiunea cea mai electronegativă nu am obținut linie de precipitare cu serul imun antifrunză totală. Celelalte fracțiuni duceau la apariția a 4 linii de precipitare în cazul proteinelor delipidate cu butanol și analizate cu un ser omolog (antiproteină delipidată) (fig. 1, *j*). Fracțiunea peroxidazică cea mai electronegativă din frunzele de porumb nu avea anticorpii corespunzători în antiserul nostru. Cercetînd izoperoxidazele din aceste cereale păioase, constatăm că nici una din fracțiunile de la start spre anod nu dă reacția de precipitare. Aceasta arată clar că ele diferă de celelalte fracțiuni peroxidazice cel puțin prin lipsa grupărilor determinante co-

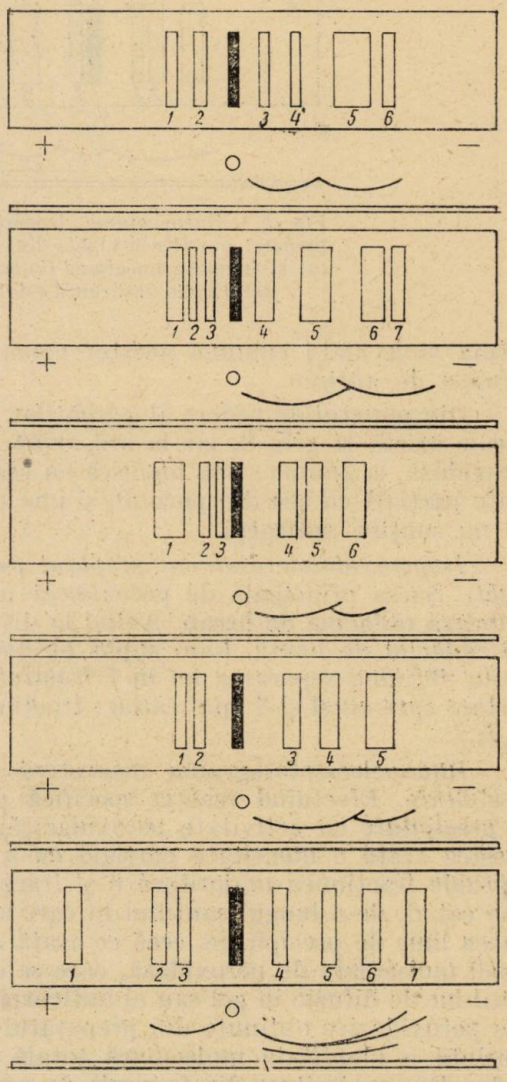


Fig. 1. — Enzimogramele izoperoxidazelor din frunzele de grîu (*a*), orz (*c*), ovăz (*e*), secară (*g*) și porumb (*i*) și imunoenzimogramele acelorași preparate proteice din frunzele de grîu (*b*), orz (*d*), ovăz (*f*), secară (*h*) și porumb (*j*) cu serul imun antifrunză totală de porumb.

mune cu ale majorității izoperoxidazelor din porumb, formînd net o altă categorie de izoenzime. Studiul acestor izoperoxidaze formează preocuparea noastră viitoare.

Tehnica Ouchterlony arăta prezența la frunzele de porumb a 2 linii cu activitate peroxidazică. În cazul preparatului proteic din frunzele de grîu se evidențiază 2 linii, iar pentru orz, ovăz și secară o singură linie.

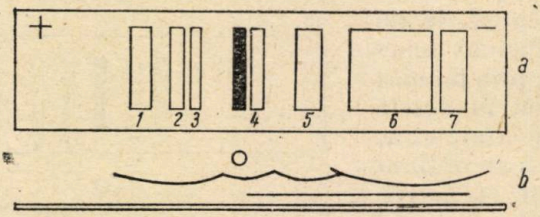


Fig. 2. — Enzimograma izoperoxidazelor dintr-un preparat pur (Koch-Light) din rădăcină de hrean (*a*) și imunoenzimograma (*b*) aceluiași preparat cu serul imun antifrunză totală de porumb.

Forma moleculară comună acestor cereale este cea care se relevă mai aproape de antiser.

Din punctul de vedere al grupărilor determinante în frunzele acestor cereale există la grîu 2, iar la orz, ovăz și secară 3 tipuri moleculare de peroxidază, și anume : una identică cu cea din porumb, a doua cu o identitate parțială cu cea din porumb și una pentru care serul imun folosit de noi nu conține anticorpi.

Izoperoxidazele dintr-un preparat pur din rădăcini de hrean (*Koch-Light*). Sursa principală de peroxidază pentru cercetările de laborator o formează rădăcina de hrean. Avînd la dispoziție un preparat pur liofilizat din rădăcini de hrean, l-am supus electroforezei în condițiile noastre de lucru, obținînd separarea lui în 7 fracțiuni peroxidazice, dintre care 3 de la start spre anod și 4 spre catod ; fracțiunea a șasea este majoritară (fig. 2, *a*).

Imunoelectroforegrama respectivă nu prezintă vizibil nici o linie de precipitare. Efectuînd reacția specifică peroxidazei, se formează 5 linii de precipitare cu activitate peroxidazică, dintre care 3 se unesc perfect. Acestea arată o identitate parțială cu a patra linie de precipitare, care cuprinde fracțiunea majoritară 6 și fracțiunea 7. În regiunea de la start spre catod, de-a lungul șanțului în care am avut antiserul, se formează a cincea linie de precipitare, ceea ce arată că în această regiune avem două specii moleculare de peroxidază, care se deosebesc cel puțin după coeficientul lor de difuzie în gel sau al anticorpilor respectivi (fig. 2, *b*). Fracțiunile peroxidazice obținute din preparatul de hrean fac parte din cele care prezintă o identitate moleculară totală sau parțială cu cea a speciilor moleculare majoritare din frunzele de porumb, cu toate că, din punct de vedere genetic, porumbul este mult mai depărtat de hrean decît de cerealele păioase cercetate. S-ar putea ca forma moleculară care formează linia de precipitare dată de fracțiunea peroxidazică majoritară să fie cea mai răspîndită.

Prin tehnica Ouchterlony de asemenea nu se evidenţiază nici o linie de precipitare vizibilă, dar la coloraţia specifică activităţii peroxidazice se obţine o linie de precipitare cu activitate peroxidazică în apropierea rezervorului de antiser.

CONCLUZII

1. Electroforetic am evidenţiat la frunzele de orz 7, la grîu şi ovăz 6, iar la secară 5 fracţiuni peroxidazice. Preparatul pur liofilizat de peroxidază din rădăcina de hrean s-a separat în 7 fracţiuni.

2. Imunoenzimogramele preparatelor proteice din frunzele acestor cereale arată că, din punctul de vedere al grupărilor determinante, există trei tipuri moleculare de peroxidază, şi anume : una identică cu cea din porumb, a doua cu o identitate parţială cu cea din porumb şi una pentru care serul imun folosit de noi nu conţine anticorpi. Grîul conţine tipurile 1 şi 3, iar orzul, ovăzul şi secara toate trei tipurile. Fracţiunile peroxidazice din preparatul pur din hrean aparţin tipurilor moleculare 1 şi 2.

3. Cercetarea izoperoxidazelor cu ajutorul serurilor imune aduce date noi pentru diferenţierea şi caracterizarea lor, demonstrînd în cazul nostru, în care am folosit doar un singur ser imun antifrunză totală de porumb, existenţa a cel puţin trei grupe de izoenzime, după grupările determinante pe care le conţin.

Prezentată la redacţie
la 31 martie 1969

Institutul de biochimie
al
Academiei Republicii Socialiste România

BIBLIOGRAFIE

1. V. Alexandrescu, I. Călin, Rev. roum. Biochim., **12** (1969).
2. L.R. Nilson, T. Hermelin, Lantbrukskogskol. Ann., **32**, 297 (1966).
3. M. Giacomelli, Nature, **213**, 1265 (1967).
4. M.A. Jermin, R. Thomas, Biochem. J., **56**, 631 (1954).
5. L.M. Shannon, E. Kay, J.Y. Lew, J. biol. Chem., **241**, 2166 (1966).
6. E. Kay, L.M. Shannon, J. Y. Lew, J. biol. Chem., **242**, 2470 (1967).
7. V. Alexandrescu, I. Călin, St. cerc. biochim., **12**, 27 (1969).

ELECTROPHORETIC AND IMMUNOELECTROPHORETIC STUDY OF ISOPEROXIDASES FROM WHEAT, BARLEY, OATS, RYE LEAVES AND FROM HORSE RADISH ROOT

SUMMARY

By agar gel microelectrophoresis 7, 6 and 5 peroxidase fractions were evidenced in leaves of barley, wheat, oats and rye, respectively, as well as 7 peroxidase fractions in horse radish.

Immunoenzymogram patterns of protein preparations from the above mentioned cereal leaves, obtained with total antileaf immune serum show 2 precipitin lines with peroxidase activity, placed towards the cathode; fractions in the anode area give no precipitation reaction. Horse radish isoperoxidases give 5 precipitin lines which include all fractions.

These results show the presence in the cereals of at least 3 groups of isoperoxidases, according to their determinant groups: one identical with that in maize, the second having a partial identity with the latter, and a 3rd for which the immune serum used by us contained no antibodies.

ST. CERC. BIOCHIM., 12, 3, 229–232 (1969)

SCINDAREA VICILINEI DIN SĂMÎNȚA DE MAZĂRE ÎN CURSUL GERMINAȚIEI

LUCIA BUZILĂ

Rezumat. — În cursul germinației semințelor de mazăre, vicilina din cotiledoane este scindată și dă naștere unui fragment de hidroliză care se menține un timp îndelungat la acest nivel.
Rezultatele sugerează că în primele stadii de hidroliză proteinele de rezervă sînt scindate în fragmente mici, care se hidrolizează ulterior în peptide sau în aminoacizi.

Globulinele de rezervă se găsesc localizate în cotiledoane în formațiuni numite corpi proteici [1], care conțin totodată enzimele proteolitice [2] capabile să hidrolizeze aceste proteine în cursul germinației. Ca rezultat al acțiunii enzimelor proteolitice, din globulinele de rezervă se eliberează fragmente proteice care au putut fi puse în evidență de unii autori în diferite faze de germinație la năut [3], fasole [4], floarea-soarelui [1] și bob [5]. Aceste rezultate sînt în dezacord cu majoritatea autorilor (vezi, de exemplu, [1]), care au arătat că proteinele nu suferă nici o modificare a eterogenității în cursul germinației.

V. Gheție [6] a explicat lipsa de concordanță a rezultatelor, analizînd factorii care pot perturba evidențierea fragmentelor de hidroliză. Unul din acești factori, pe care noi l-am reținut în această lucrare, a fost acela că fragmentele de hidroliză sînt „mascate" de proteinele nehidrolizate, cotiledoanele semințelor conținînd o populație celulară eterogenă în raport cu gradul de scindare a proteinelor de rezervă.

Din acest motiv, ne-am propus să urmărim în procesul germinativ soarta unei singure proteine — vicilina. Pentru a putea înregistra apariția eventuală a fragmentelor de hidroliză, am efectuat analiza imunoelectroforetică cu un ser imun monospecific antivicilină. În acest fel, restul proteinelor cotiledonare nu s-au mai evidențiat imunoelectroforetic și nu au stînjenit observarea produșilor de scindare ai vicilinei.

MATERIAL ȘI METODĂ

Germinarea semințelor, recoltarea probelor și extracția proteinelor. Semințe de mazăre (*Pisum sativum*) din soiul Ceres s-au germinat la temperatura laboratorului, în cutii Petri căptușite cu hîrtie de filtru umezită. După 2, 5, 7, 9, 20 și 30 de zile s-au colectat un număr de semințe

cu dezvoltare egală şi s-au disociat în cotiledoane şi ax embrionar. Cotiledoanele şi axul embrionar, luate separat, s-au mojarat cu nisip de cuarţ, adăugînd 5 părţi soluţie NaCl 0,145 M la o parte material în stare umedă pentru probele de cotiledoane de 2 şi 5 zile şi 2 părţi soluţie NaCl 0,145 M la o parte material în stare umedă pentru cotiledoanele de 7, 9, 20 şi 30 de zile şi pentru toate probele de embrioni. După o extracţie de 30 min la temperatura laboratorului, omogenatele s-au centrifugat la 6 000 g timp de 30 min. Supernatantele s-au analizat imunoelectroforetic.

Analiza imunoelectroforetică. S-a utilizat metoda lui J. J. Scheidegger [7] în gel de agaroză 1%, tampon veronal-veronal sodic pH = 8,6, μ = 0,05 (în cuvă) şi 0,016 (în plăci). S-au aplicat un potenţial de 6—8 V/cm, o intensitate de 1 mA/cm şi un timp de migrare de 2 ore. După imunodifuzie, plăcile s-au prelucrat după tehnica uzuală [8]. S-a utilizat un ser de iepure antivicilină. Prepararea şi controlul specificităţii acestui ser au fost descrise într-o altă lucrare [9].

Izolarea şi purificarea vicilinei. Metoda a fost descrisă într-o lucrare anterioară [10].

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Rezultatele analizei imunoelectroforetice a extractelor din cotiledoane în diferite faze de germinaţie sînt redate în figura 1.

Examinarea diagramelor conduce la următoarele constatări:

a) Serul imun antivicilină reacţionează nu numai cu vicilina, dar şi cu un component cu o sarcină electrică negativă mai mare. Acest component a fost identificat tentativ cu legumina, pe baza constatării lui J. Kloz şi V. Turkova [11] că serul de iepure antivicilină reacţionează cu legumina, dînd o linie de precipitare care se întretaie cu aceea a vicilinei.

b) Linia de precipitare *x* poate corespunde unui fragment ce se desprinde din molecula de vicilină. El nu apare decît la a 5-a zi de germinaţie, în acord cu datele lui C.E. Danielsson [12], care au arătat că în seminţele de mazăre hidroliza proteinelor de rezervă începe abia după 5 zile de la punerea seminţelor în condiţii de germinaţie. Fragmentul de hidroliză se menţine în cotiledoane pînă în fazele tîrzii ale germinaţiei, cînd cotiledoanele sînt aproape complet golite de conţinutul lor proteic.

c) Dispariţia mai timpurie a liniei de precipitare date de legumină decît cea a vicilinei arată că aceste două globuline de rezervă nu sînt hidrolizate cu aceeaşi viteză, fapt de asemenea în acord cu constatările altor autori [1]. Prezenţa liniei *x* într-o fază a germinaţiei în care în cotiledoane nu mai există legumină exclude posibilitatea ca ea să provină din hidroliza leguminei.

d) Fragmentul *x* se păstrează în cotiledoane într-o fază în care la acest nivel nu mai există vicilina. Soarta acestui fragment nu a putut fi precizată. Pare verosimil ca el să fie degradat mai departe pînă la aminoacizii componenţi, însă nu poate fi exclusă nici posibilitatea translocării sale la nivelul axului embrionar [13], cu atît mai mult cu cît extractele din axul embrionar de la 7 zile prezintă o linie de precipitare asemănătoare cu cea dată de fragmentul *x*.

Serul imun antivicilină nu reacţionează decît cu extracte din axul embrionar negerminat, dînd cele 2 linii de precipitare pentru vicilină şi legumină.

Faptul că deja în ziua a 2-a de germinaţie în axul embrionar nu se mai pot identifica legumina şi vicilina sugerează că la acest nivel ar putea

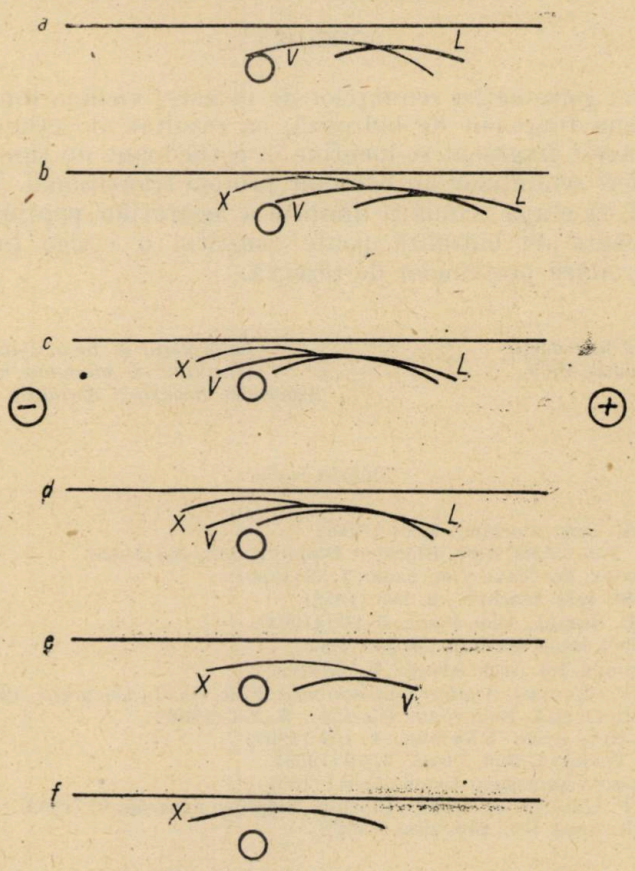


Fig. 1. — Analiza imunoelectroforetică a extractelor din cotiledoane de mazăre în cursul germinaţiei.
a — 2 zile; *b* — 5 zile; *c* — 7 zile; *d*—9 zile; *e*—20 de zile; *f*—30 de zile.
L — legumina; *V* — vicilina; *X* — fragment de hidroliză.
Ser imun de iepure antivicilină.
Linia de precipitare a vicilinei a fost identificată ca atare cu ajutorul unui preparat de vicilină pur.

avea loc o intensă hidroliză timpurie. De fapt, posibilitatea ca axul embrionar să-şi folosească propriile sale substanţe de rezervă a fost sugerată de experienţele care au arătat că în seminţele de mazăre lipsite de cotiledoane axul embrionar creşte şi se dezvoltă timp de 7 zile chiar în medii lipsite de azot [14].

Serul imun antivicilină poate evidenţia numai acele fragmente de hidroliză care poartă în molecula lor o parte din grupările determinante ale moleculei intacte. De aceea, linia de precipitare x are capătul său

anodic foarte apropiat, dacă nu chiar în contact cu linia vicilinei, semn al unei reacţii de identitate parţială. Este însă adevărat că în cursul hidrolizei vicilinei s-ar putea desprinde şi fragmente faţă de care în serul nostru imun să nu existe anticorpi specifici, prezenţa lor trecînd astfel neobservată.

CONCLUZII

În cursul germinaţiei seminţelor de mazăre, vicilina din cotiledoane dă naştere unui fragment de hidroliză, ca rezultat al acţiunii enzimelor proteolitice. Acest fragment se menţine în cotiledoane un timp îndelungat şi poate conferi seminţelor un caracter proteic tranziţional. Experienţele noastre arată că etapa scindării limitate a legăturilor peptidice care formează fragmente de hidroliză poate constitui o verigă importantă a mersului degradării proteinelor de rezervă.

Prezentată la redacţie
la 14 ianuarie 1969

Laboratorul de imunochimie
Institutul de biochimie al
Academiei Republicii Socialiste România

BIBLIOGRAFIE

1. V. Gheţie, St. cerc. biochim., **9**, 91 (1966).
2. L.Y. Yatsu, T.J. Jacks, Arch. Biochem. Biophys., **124**, 466 (1968).
3. N.A. Radionova, Tr. Glavn. Bot. Sada., **7**, 32 (1960).
4. V. Gheţie, St. cerc. biochim., **2**, 293 (1959).
5. V. Gheţie, L. Buzilă, Biol. Plant., **5**, 203 (1964).
6. V. Gheţie, Rev. roum. Biochim., **3**, 353 (1966).
7. J.J. Scheideggir, Int. Arch. Allergy, **7**, 103 (1955).
8. V. Gheţie, V. Micuşan, *Analiza imunochimică*, Edit. Acad., Bucureşti, 1966, p. 307–309.
9. V. Gheţie, L. Buzilă, Rev. roum. Biochim., **5**, 271 (1968).
10. L. Buzilă, Rev. roum. Biochim., **4**, 103 (1967).
11. J. Kloz, V. Turkova, Biol. Plant., **5**, 29 (1963).
12. C. E. Danielsson, Acta chem. scand., **5**, 541 (1951).
13. L. Ledoux, P. Galand, R. Huest, Biochim. biophys. Acta, **55**, 97 (1962).
14. G. Goas, C.R. Acad. Sci., **249**, 2383 (1962).

BREAKDOWN OF VICILIN IN PEA SEEDS DURING GERMINATION

SUMMARY

During pea seed germination vicilin in cotyledons is split, yielding a digest fragment which is maintained for a long time at this level.

Results suggest that in the first stages of hydrolysis reserve proteins are split into small fragments which are subsequently broken down to peptides or amino acids.

ST. CERC. BIOCHIM., 12, 3, 233 – 237 (1969)

ACȚIUNEA RAZELOR ULTRAVIOLETE ASUPRA SORBȚIEI ALBASTRULUI DE TOLUIDINĂ DE CĂTRE ȚESUTUL FOLIAR DE TOMATE

SIMONA CEAUȘESCU

Rezumat. — Cercetarea însușirii de sorbție pentru albastrul de toluidină a țesutului foliar al diferitelor soiuri de tomate a arătat că : această sorbție depinde de natura soiului, crește sub acțiunea razelor ultraviolete și variază în funcție de vîrsta plantelor.

Cercetările efectuate de V. Ia. Alexandrov și D. N. Nasonov [1] au arătat că iradierea cu raze ultraviolete mărește capacitatea de sorbție a proteinelor din serul sanguin pentru diferiți coloranți. S-a considerat că efectul acesta se datorește denaturării proteinelor serice de către razele ultraviolete.

Se pare că cercetări de acest gen nu au fost efectuate pînă acum pe material vegetal, deși ar prezenta interes pentru cunoașterea comportării și sensibilității țesuturilor vegetale față de razele ultraviolete. De aceea am urmărit efectul produs de aceste raze asupra țesutului foliar, cercetînd modificarea însușirilor lui de sorbție față de albastrul de toluidină, colorant care a mai fost folosit și pentru cercetarea însușirilor de sorbție a diferitelor proteine de origine animală [1].

În primul rînd, am cercetat dacă la diferite soiuri de tomate însușirile de sorbție față de albastrul de toluidină sînt sau nu modificate de către razele ultraviolete și cît de mari sînt deosebirile respective. În acest scop, imediat după iradiere, țesuturile erau introduse în soluție de colorant pentru o anumită perioadă de timp, apoi colorantul pătruns în țesut era extras și dozat colorimetric (varianta experimentală A).

Apoi am cercetat cum variază însușirile de sorbție ale țesutului foliar după încetarea iradierii. În acest scop, țesutul iradiat era introdus în soluția de colorant la diferite intervale de timp după iradiere, procedîndu-se la fel ca în cazul precedent (varianta experimentală B.).

MATERIAL ȘI METODĂ

Am lucrat pe frunze de tomate din soiurile Eurocross, Alround, Olandez, Apollo, Seelandia, Monimeker și Sioux de pe plante crescute în seră.

Din partea dreaptă și stîngă a unei frunze se tăiau bucăți simetrice de cîte 0,50 g fiecare, dintre care una se păstra într-o cutie Petri, iar

cealaltă se iradia cu raze ultraviolete. Iradierea se efectua cu o lampă „Solimed Quarzlampe Bruno Höpfel Mecklemburg", timp de 5 min, de la distanța de 0,5 m.

Pentru determinarea sorbției țesuturilor foliare pentru albastrul de toluidină am recurs la o tehnică asemănătoare cu cea propusă de A.A. Braun și M. F. Ivanov [2] pentru cercetarea sorbției musculaturii striate și a altor organe.

În cazul variantei experimentale A, atît bucata de frunză iradiată, cît și cea neiradiată (proba martor) se tăiau imediat după iradiere în fîșii de cîte 1 mm lățime, care se introduceau pentru 30 min în cîte 5 ml soluție apoasă de albastru de toluidină 0,1%. Apoi soluția colorantului se decanta, iar materialul foliar colorat în albastru se spăla repetat cu cantități mici de soluție apoasă de clorură de potasiu 1%, pînă cînd aceasta nu se mai colora; în fine, peste materialul colorat se turnau cîte 10,0 ml alcool acidulat (75 ml alcool 96°, 23 ml apă distilată și 2 ml acid clorhidric concentrat d = 1,19) și se lăsa la temperatura laboratorului timp de 24 de ore. Alcoolul acidulat extrăgea colorantul din materialul vegetal și soluția astfel obținută se colorimetra la un fotocolorimetru Pulfrich IOR față de o soluție (0,002 %) preparată prin dizolvarea albastrului de toluidină în alcool acidulat. Rezultatul analizei se exprima în mg de colorant, raportate la 100 g frunze.

În cazul variantei experimentale B se iradiau simultan mai multe probe de frunze, dintre care unele se tăiau în fîșii și se introduceau în soluție de colorant imediat după iradiere, iar altele după 30, 60 și, respectiv, 90 min de la iradiere. În continuare se proceda la fel ca în cazul variantei experimentale A. Se înțelege că în același mod se proceda și cu porțiunile corespunzătoare simetrice ale frunzelor care nu se iradiau și constituiau probele-martor.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

În cadrul variantei experimentale A, am cercetat sorbția țesutului foliar la toate soiurile de tomate menționate mai înainte. Unele rezultate experimentale obținute pe plante tinere, neînflorite, sînt prezentate în figura 1 și ne permit să facem următoarele constatări :

Prima : sorbția albastrului de toluidină de către țesutul foliar neiradiat cu raze ultraviolete nu este identică la toate soiurile de tomate, ci variază în funcție de soi.

A doua : independent de soiul de tomate, frunzele iradiate cu raze ultraviolete sorb o cantitate mai mare de colorant decît cele neiradiate.

A treia : efectul produs de razele ultraviolete asupra sorbției variază în funcție de soi și se manifestă cu atît mai puternic cu cît sorbția materialului neiradiat este mai mică.

În cadrul variantei experimentale B am cercetat sorbția țesutului foliar al tomatelor din soiul Sioux atît pe plante tinere neînflorite, cît și pe plante din același lot cu două luni mai bătrîne, adulte și înflorite, pentru a stabili dacă însușirile de sorbție ale țesutului foliar pentru albastrul de toluidină variază în funcție de vîrsta plantelor și cum se manifestă

efectul iradierii cu raze ultraviolete în funcţie de vîrstă. Rezultatele experimentale prezentate în figura 2 ne permit să facem următoarele constatări :

Prima : sorbţia albastrului de toluidină de către ţesutul foliar neiradiat cu raze ultraviolete este mult mai puternică la plantele tinere decît la cele adulte.

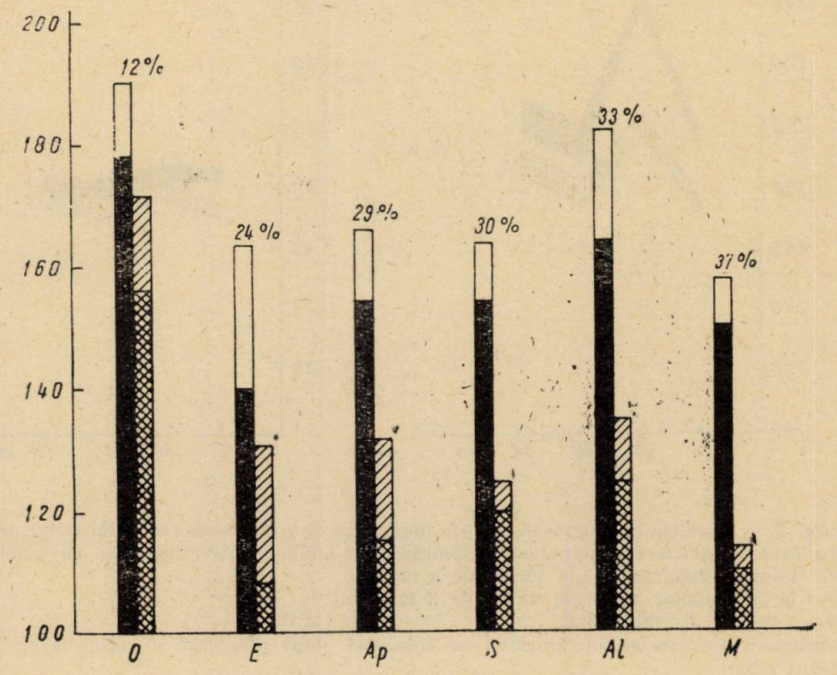


Fig. 1. — Sorbţia ţesutului foliar iradiat cu raze ultraviolete şi neiradiat al diferitelor soiuri de tomate, pentru albastrul de toluidină.
Ordonata : cantitatea albastrului de toluidină (mg) pătrunsă şi reţinută de 100 g ţesut foliar iradiat (coloanele din stînga) şi neiradiat martor (coloanele din dreapta). Înălţimea coloanelor exprimă atît valorile maxime ale sorbţiei, cît şi cele minime observate. Creşterea medie a sorbţiei la ţesutul iradiat faţă de sorbţia medie a ţesutului martor este exprimată în procente. Ordonata : mg albastru de toluidină. Abscisa : diferite soiuri de tomate, şi anume : Al — Alround, Ap — Apollo, E — Eurocross, M — Monimecker, O — Olandez, S — Seelandia.

A doua : independent de vîrsta plantelor, frunzele iradiate cu raze ultraviolete sorb o cantitate mai mare de colorant decît cele neiradiate. La plantele tinere, creşterea sorbţiei provocată de iradiere este însă mai pronunţată decît la plantele adulte.

A treia : la frunzele desprinse de pe plante şi neiradiate cu raze ultraviolete, sorbţia pentru albastrul de toluidină nu rămîne constantă, ci variază în funcţie de timp ; după 30 min creşte, revine apoi la valori iniţiale după 60 min şi prezintă o nouă creştere după 90 min. Variaţiile acestea sînt mult mai accentuate la plantele tinere decît la cele adulte.

A patra : la frunzele desprinse de pe plante și iradiate cu raze ultraviolete, sorbția pentru albastrul de toluidină prezintă variații în funcție de timp asemănătoare cu cele de la frunze neiradiate, fiind însă mult mai accentuate decît la acestea din urmă.

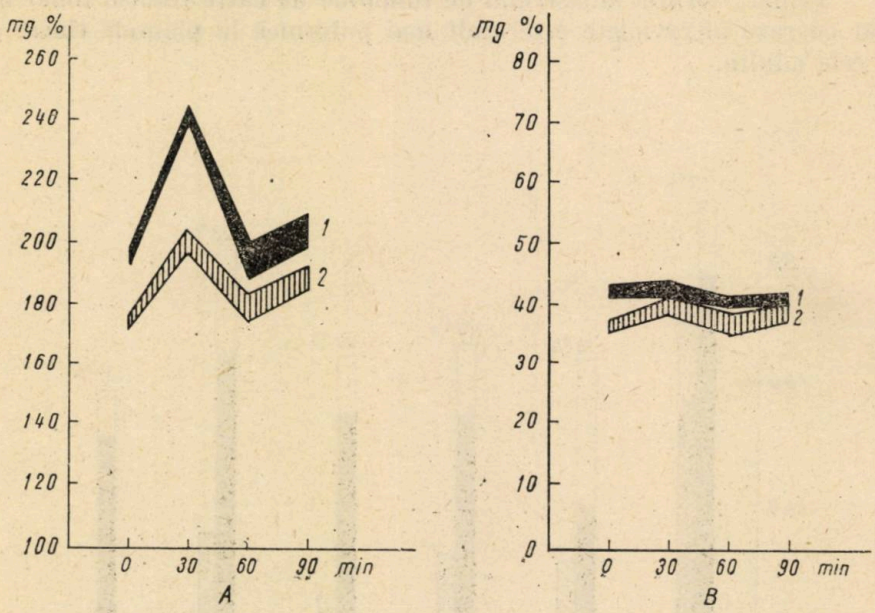


Fig. 2. — Variația în funcție de timp a însușirilor de sorbție ale țesutului foliar, iradiat cu raze ultraviolete și neiradiat, la tomate soiul Sioux, pentru albastrul de toluidină.
A : la țesut foliar tînăr (în vîrstă de o lună).
B : la țesut foliar adult (în vîrstă de 3 luni).
1 — iradiat ; *2* — neiradiat.
Ordonata : cantitatea de albastru de toluidină (mg) pătrunsă și reținută de 100 g țesut foliar.
Abscisa : timpul în minute după încetarea iradierii.
Reprezentarea grafică exprimă atît valorile experimentale maxime, cît și cele minime obținute în fiecare caz în parte.

CONCLUZII

Iradierea cu raze ultraviolete a țesutului foliar de tomate mărește însușirile de sorbție ale acestui țesut pentru albastrul de toluidină. Intensitatea acestui efect depinde de soiul plantelor și variază cu vîrsta acestora.

Prezentată la redacție
la 27 ianuarie 1969

Catedra de biochimie
a
Universității București

BIBLIOGRAFIE

1. Alexandrov V. Ia., Nasonov D. N., Arhiv. Anat. Histol. i Embriol., **22**, 11 (1939).
2. Braun A. A., Ivanov M. F., Arhiv. Anat. Histol. i Embriol., **12**, 3 (1933).

UV-RAYS ACTION ON THE TOLUIDINE BLUE SORPTION BY THE TOMATO FOLIARY TISSUE

SUMMARY

The investigation of the sorption of toluidine blue by the foliary tissue în various tomato sorts, shows that it is dependent on the individual plant sort. It increases under the action of UV-rays and varies with the plant age.

ST. CERC. BIOCHIM. 12, 3, 239–244 (1969)

STUDIUL MODIFICĂRILOR INDUSE DE CĂTRE RADIAȚIILE GAMMA ÎN STRUCTURA PROTEINELOR ȘI A ACIZILOR NUCLEICI, CU AJUTORUL SPECTROMETRIEI ÎN INFRAROȘU

GH. FURNICĂ și VIORICA URSU

Rezumat. — Studiul spectrului în infraroșu la proteine a precizat drept caracteristice frecvențele atribuite legăturilor N—H, C=O și — CO—NH—. La acizii nucleici se evidențiază frecvențele ce pot caracteriza legăturile C—N, C=N, P—O și C—O.

Iradierea acestor biomacromolecule polielectrolitice cu doze de radiații gamma de la ^{60}Co, de ordinul 2.10^6R sau de $1{,}1.10^{20}$ eV/g, determină o serie de modificări în intensitatea corespunzătoare benzilor caracteristice.

Rezultatele obținute indică o radiosensibilitate diferită a biopolielectroliților studiați. Ea descrește în ordinea : albumină, gamma-globulină, ADN, ARN.

Încă din 1952 Sutherland [1] a arătat posibilitatea identificării la proteine a unor funcțiuni chimice, prin analiza macromoleculelor în infraroșu. Fritsche [2] aplică analiza în infraroșu la acidul dezoxiribonucleic, mai ales în ceea ce privește schimbul atomilor H și D din ADN, și identifică astfel legătura C-H la 3120 cm^{-1}. Lascombe și Josien [3] demonstrează aplicabilitatea studiilor spectrometriei în infraroșu la clarificarea problemelor de interacțiune la macromolecule. Susi și colab. [4] aplică spectrometria în infraroșu la studiul proteinelor în soluții apoase, urmărind modificările la 1650 cm^{-1} în legătură cu puntea de hidrogen : —C =O...H—N. Prin schimbarea intensității de absorbție, ei evidențiază interacțiunea proteinelor cu apa la nivelul legăturii de hidrogen.

Iradierea proteinelor și a acizilor nucleici cu doze mari de radiații gamma induce o serie de modificări în structura macromoleculelor, pînă la nivelul funcțiunilor chimice [5], [6], [7]. Riesz și colab. [8], [9] evidențiază radicali liberi la gamma-globulina iradiată, în urma desfacerii legăturilor C—H și S—H. Marble [10] determină prin RES formarea în osul iradiat cu 1.10^4 — 2.10^5 rad a unui dublu radical liber, analog colagenului sau poliglicinei iradiate, de forma :. NH—CH—CO. Henriksen [11] relevă fixarea oxigenului la radicalul proteinelor iradiate, cu formarea unor funcțiuni oxigenate $R—CH_2—SO_2$. Brown și Akayonoglu [12] arată modificarea unor proprietăți fizico-chimice ale mioglobinei iradiate. Într-o altă lucrare, Riesz [13] evidențiază formarea prin iradierea ribonucleazei a unor radicali de forma :

$$\ldots—NH—\underset{\displaystyle CH_2—S.}{\underset{|}{CH}}—CO\ldots \text{și} \ldots—NH—\dot{C}H—CO—\ldots$$

O serie de monografii evidențiază acest aspect, fără a aprofunda studiul spectrometric în infraroșu aplicat biomacromoleculei iradiate [21]—[25].

În contextul cunoștințelor amintite mai sus, referitoare la transformările suferite de către proteine și acizii nucleici sub acțiunea radiațiilor gamma, se impun investigații suplimentare la nivelul legăturilor chimice decelabile prin absorbția în domeniul infraroșu, de aceea ne-am propus să urmărim eventualele modificări în intensitatea de absorbție în infraroșu, după iradierea cu doze mari, de $2{,}0 \cdot 10^6$ R($2 \cdot 10^5$R/s), a albuminei, gamma-globulinei, ADN și ARN.

MATERIAL ȘI METODĂ

Spectrul de absorbție în infraroșu s-a studiat cu aparatul U.R. 10 Zeiss-Jena, automatizat. Analiza spectrală s-a efectuat în limitele frecvențelor caracteristice de 400 — 4 000 cm^{-1}, prin schimbarea automată a prismelor de KBr și LiF. Absorbția s-a înregistrat direct pe hîrtia gradată pe verticală și etalonată pe orizontală în frecvențe caracteristice. Spectrul s-a verificat cu KBr, utilizat ca mediu de dispersie, pentru a se evidenția eventuale maxime de absorbție, stabilindu-se puritatea spectroscopică a KBr. Probele analizate au fost diluate pînă la o concentrație de 0,5% macromolecule în KBr.

S-au apreciat grafic diferențele dintre maximul și minimul de absorbție în infraroșu, stabilindu-se astfel intensitatea de absorbție la o anumită frecvență caracteristică.

S-au utilizat preparate biochimice cît mai pure, cum sînt: albumină bovină cristalizată (NBCo), gamma-globulină purificată (NBCo), ARN (Haën-Hannover) și ADN (Schuchardt-München). O anumită porțiune din fiecare probă a fost iradiată în stare uscată cu radiații gamma de la o sursă de ^{60}Co (GUT-400), cu doza de 2.10^6R (2.10^5R/s), ceea ce corespunde la $1{,}1.10^{20}$eV/g produs. Iradierea s-a efectuat în contact cu aerul; apoi probele solide iradiate și cele neiradiate au fost uscate în vid, la 2 mm Hg și pe P_2O_5. Pastilate împreună cu KBr, probele au fost din nou uscate în vid, la 2 mm Hg și pe P_2O_5 timp de 24 de ore, pentru a se elimina umiditatea aderentă.

REZULTATE

În toate cazurile se obțin benzi de absorbție și nu linii distincte. La albumină (fig. 1) se evidențiază cîteva benzi și maxime de absorbție, și anume: o bandă lată, cuprinsă între 1000 și 1 800 cm^{-1}, și alta cuprinsă între 2800 și 3600 cm^{-1}. La prima bandă se mai disting cîteva maxime la 1400, 1540, 1640 și 2020 cm^{-1}, iar la cea de-a doua se disting maxime la 2950 și 3300 cm^{-1}.

După iradierea albuminei se constată cîteva modificări în spectrul de absorbție.Se intensifică banda cuprinsă între 1000 și 1800 cm^{-1} și cea cuprinsă între 2500 și 3600 cm^{-1} cu aproximativ 45%. Sînt mai evidente maximele de la 1640 cm^{-1}, precum și cele de la 3300 cm^{-1}.

La gamma-globulină (fig. 2), cu un spectru apropiat de acela al albuminei, se evidențiază la fel cele două benzi, cu maxime bine conturate la 1540 și 1650 cm^{-1}. După iradierea globulinei, în comparație cu proba neiradiată, se constată că benzile de absorbție sînt cu 27,45% mai intense. Maximele de la 1540 și 1650 cm^{-1} sînt mai puțin conturate, deși banda întreagă s-a intensificat cu 45%.

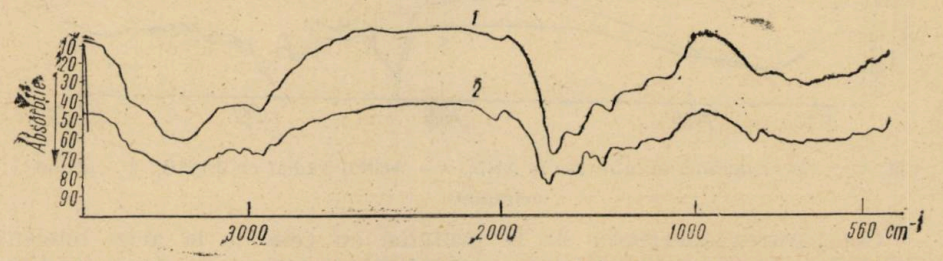


Fig. 1. — Spectrograma în infraroșu la albumina cristalizată. *1* — Proteina iradiată cu 2.10^6R; *2* — proteina neiradiată.

Spectrul în infraroșu al ARN (fig. 3), format din două benzi largi, evidențiază foarte bine cîteva maxime de absorbție, la 1050—1150, 1250 și 1700 cm^{-1}. După iradierea probei de ARN se constată o intensificare

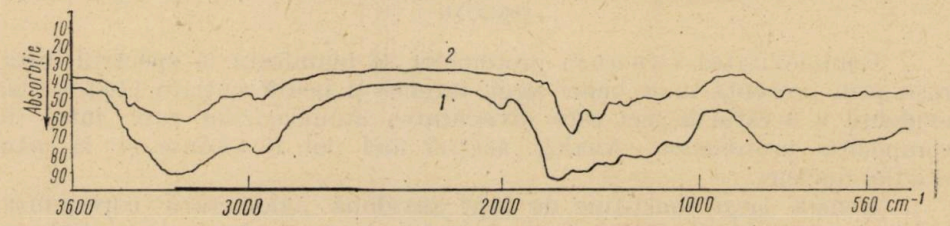


Fig. 2. — Spectrograma în infraroșu la gamma-globulină. *1* — Proteina iradiată 2.10^6 R; *2* — proteina neiradiată.

cu 27% a benzilor cuprinse între 900 și 1800 cm^{-1} și o diminuare cu 11% a benzilor cuprinse între 2600 și 3700 cm^{-1}. De remarcat faptul că după iradiere sînt mai bine conturate maximele de la 1050—1150, 1250, 1700 și 2920 cm^{-1}.

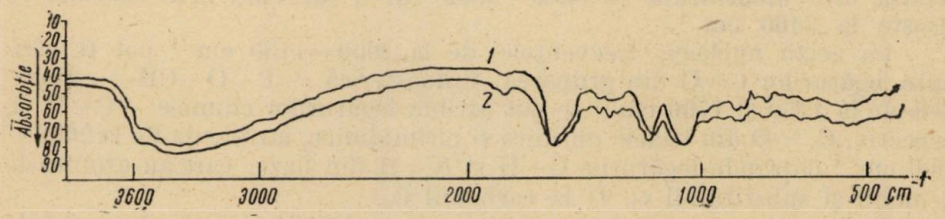


Fig. 3. — Spectrograma în infraroșu la ADN. *1* — Acidul iradiat cu 2.10^6 R; *2* — acidul neiradiat.

La ADN, analog cu ARN (fig. 4), spectrul în infraroșu este format din două benzi late, cu maxime conturate la 800, 1050—1150, 1250 și 1700 cm^{-1}. După iradiere, intensitate benzilor scade cu 30—48%

mai ales pentru maximele de la 800, 1050—1150 și 1700 cm^{-1}, care scad cu 33%. De menționat că banda lată de la 2600—3100 cm^{-1} scade în intensitate cu 48%.

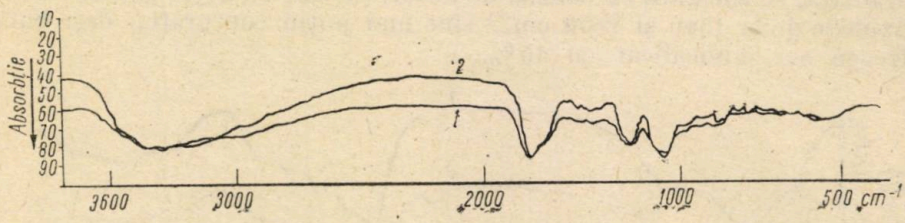


Fig. 4. — Spectrograma în infraroșu la ARN. *1* — Acidul iradiat cu 2.10^6R; *2* — acidul neiradiat.

Compararea spectrelor de la proteine cu cele de la acizi nucleici ne permite să observăm diferențe mai puțin pronunțate după iradiere la ARN și ADN, precum și diferențe mai pronunțate la proteine. Compararea separată a spectrelor relevă că, după iradiere, diferențele sînt mai pronunțate în următoarea ordine crescîndă: albumină, gamma-globulină, ADN și ARN.

DISCUȚII

Complexitatea structurii proteinelor se manifestă în spectrul infraroșu prin prezența unor benzi largi, intense și nediferențiate [14]. Cauza evidentă a acestui aspect este diversitatea aminoacizilor care intră în compoziția proteinelor. Analog acestei idei pot fi extinse și la cazul acizilor nucleici.

Benzile largi constituie de fapt anvelopa aglomerării corespunzătoare resturilor individuale de aminoacizi, care se suprapun parțial sau total. Frecvențele caracteristice proteinelor sînt legate de gruparea —NH—CO—, la care contribuie diverse efecte de deformare. În acest sens, se atribuie funcției C = O extinse frecvențele cuprinse între 1630 și 1660 cm^{-1}, iar pentru legăturile neasociate frecvențele se deplasează la 1680 — 1700 cm^{-1}. Funcția N—H deformată este găsită la 1520—1550 cm^{-1}, iar dacă este neasociată, la frecvențe mai mici de 1520 cm^{-1}. Aceeași funcție N—H extinsă este identificată la 3280—3300 cm^{-1}, iar cînd este asociată se găsește la 3460 cm^{-1}.

La acizii nucleici, frecvențele de la 1050—1150 cm^{-1} pot fi atribuite legăturilor C—O din gruparea fosfoesterică —P—O—CH—. Maximele de la 1250 și 1700 cm^{-1} se pot atribui legăturilor chimice —C—H și, respectiv, C = O din bazele purinice și pirimidinice, iar banda de la 2600—3300 cm^{-1} cuprinde legăturile C—H și N—H din baze, care au atomul de H mobil și substituibil cu D la carbonul C_8.

Interpretarea aspectelor în infraroșu este dificilă mai ales la molecule complexe și, în general, se bazează pe lucrările efectuate asupra unor molecule mai simple [14]. La acizii nucleici, majoritatea cercetărilor spectrometrice s-au efectuat în ultraviolet [15], [16]; totuși, studiul modificărilor la nivelul diverselor legături chimice poate fi efectuat în infraroșu [2], [3].

Modificările induse de către radiațiile ionizante în macromoleculele studiate, reflectate în spectrele în infraroșu corespunzătoare, pot fi atribuite următoarelor transformări:

Intensificarea după iradierea albuminei a benzilor de la 1000—1800 cm^{-1}, 2500—3600 cm^{-1} și a maximelor de la 1640 și 3300 cm^{-1} dă indicații asupra unor transformări la nivelul legăturilor C—O din alcooli (1050—1150 cm^{-1}), C=O din amide (1650 cm^{-1}) și N—H din amide (3300 cm^{-1}). Analog este cazul la gamma-globulină, la care maximele de la 1540 și 1650 cm^{-1} sînt mai puțin intense. Prin urmare, transformările induse în globulină, cu efect invers celor din cazul albuminei, pot fi localizate la nivelul legăturilor O=C—O din carboxilul ionizat (1540 cm^{-1}) și C=O din amidă (1650 cm^{-1}). Celelalte efecte localizate la legăturile C—O din alcooli (1050—1150 cm^{-1}) și N—H din amide (3300 cm^{-1}) sînt analoge celor din cazul albuminei.

Iradierea ARN, prin efectele decelate în spectrul în infraroșu, se manifestă mai ales la nivelul C—O din alcooli (1050 cm^{-1}) sau din gruparea fosfoesterică P—O—CH— (1150 cm^{-1}), precum și la nivelul legăturilor C—H (1250 cm^{-1}) și C=O din baze (1700 cm^{-1}). Diminuarea benzii de la 2600—3700 cm^{-1}, cu apariția unui maxim la 2920 cm^{-1}, indică transformări la nivelul legăturilor C—H din adenină, guanină, citozină și timidină (3087—3130 cm^{-1}) și N—H din baze (3300 cm^{-1}) care au atomul de H mobil și pot realiza punți de hidrogen (—O—H...O— la 2940—3400 cm^{-1} și —N—H... N— la 3050—3300 cm^{-1}). Maximul de la 2920 cm^{-1} evidențiază, probabil, apariția unor noi punți de hidrogen.

Iradierea ADN indică prin spectrul în infraroșu eventuale transformări la nivelul următoarelor legături chimice: legătura C—C dintr-un ciclu cu caracter aromatic (750—800 cm^{-1}), C—O din alcooli (1050 cm^{-1}), P—O—CH— fosfoesterică (1150 cm^{-1}), C—H din baze (1250 cm^{-1}), C=O din baze (1700 cm^{-1}) și N—H din baze (3300 cm^{-1}).

Unii cercetători arată că benzile de la 900—1 300 cm^{-1} se referă la oscilațiile grupărilor C=N—, C=O și C=C ale bazelor, iar benzile 3000—3500 cm^{-1} se referă la oscilațiile grupărilor amino și hidroxil de la legăturile de hidrogen [20].

Intensitatea diferită a transformărilor de la proteine și acizi nucleici ar fi interpretabilă printr-o radiorezistență crescută a celor din urmă. Stabilitatea acizilor nucleici s-ar datora efectului de radiorezistență moleculară, atribuită ciclurilor cu caracter aromatic [17], [18], care se găsesc din abundență în macromolecula de ARN și ADN. Aceste cicluri cu caracter aromatic apar îndeosebi la bazele purinice și pirimidinice, prin enolizarea funcțiilor C=O [23]. Prezența unor nuclee aromatice este posibilă și în macromolecula proteinelor, ceea ce conferă acestora radiosensibilitate diferită în funcție de numărul nucleelor aromatice existente la fiecare moleculă [24].

Rezultatele prezentate permit să admitem posibilitatea unor transformări intramoleculare în macromoleculele iradiate. Aceste transformări pot avea loc prin apariția și dispariția unor funcțiuni organice, fără a se scinda macromolecula. Astfel de transformări au fost puse în evidență și cu ocazia altor determinări [19].

Prezentată la redacție
la 2 noiembrie 1968

Institutul de igienă și
Universitatea București

BIBLIOGRAFIE

1. G. B. M. Sutherland, Advanc. Protein Chem., **6**, (1952).
2. H. Fritsche, Studia Biophysica, **4**, 53 (1967).
3. J. Lascombe, Merie-Louise Josien, J. Chim. Phys., **65**, 152 (1968).
4. H. Susi, S.N. Timasheff, Linda Stevens, J. biol. Chem., **242**, 5460, 5467 (1967).
5. G. Furnică, C. Teodorescu, Rev. roum. Biochim., **4**, 175 (1967).
6. Gh. Furnică, Minodora Radu, St. cerc. biochim., **8**, 451 (1965).
7. Gh. Furnică, Rev. roum. Biochim., **2**, 235 (1965).
8. P. Riesz, F.H. White, Nature, **216**, 1208 (1967).
9. F.H. White, P. Riesz, H. Kon, Radiat. Res., **32**, 744 (1967).
10. G. Marble, R. Valderas, C.E.A. France Rap., **R—2910** (1966).
11. Th. Henriksen, Radiat. Res., **32**, 892 (1967).
12. W. D. Brown, J.H.A. Akayonoglu, Arch. Biochem. Biophys., **107**, 239 (1964).
13. P. Riesz, F.H. White, H. Kon, J. amer. chem. Soc., **88**, 872 (1966).
14. Margareta Avram, G.H.D. Mateescu, *Spectroscopia în infraroşu*, Edit. tehnică, Bucureşti, 1966, p. 538.
15. R. Portocală, L. Popa, *Acizii ribonucleici celulari şi virali*, Edit. Academiei, Bucureşti, 1966, p. 111.
16. M. Furnică, St. cerc. biochim, **10**, 227 (1967).
17. M. Haissinsky, *Actions chimiques et biologiques de radiations*, Masson, Paris, 1955, p. 173.
18. R. O. Balt, J. G. Carrol, *Radiaton Effects on Organic Materials*, Acad. Press, New York, 1963, p. 85, 127.
19. Gh. Furnică, A. Dimitriu, St. cerc. biochim., **6**, 411 (1963).
20. E. E. Criss, C. B. Iaţimirski, Uspekhi Khim., **35**, 349 (1966).
21. Cl. Nicolau, Z. Simon, *Biofizica moleculară*, Edit. ştiinţifică, Bucureşti, 1968.
22. D.J. Pizzarello, R. L. Witcofski, *Basic Radiation Biology*, Lea & Febiger, Londra, 1967.
23. D. E. Green, R. F. Goldberger, *Molecular Insights into the Living Process*, Acad. Press, New York, 1967.
24. E. S. Capeland, European J. Biochem., **1**, 312 (1967); Radiat. Res., **35**, 437 (1968).
25. G. H. Haggis, D. Michie, *Introducere în biologia moleculară*, Edit. ştiinţifică, Bucureşti, 1968.

IR SPECTROPHOTOMETRIC STUDY OF THE CHANGES INDUCED BY GAMMA IRRADIATION IN THE STRUCTURE OF PROTEINS AND NUCLEIC ACIDS

SUMMARY

IR studies of the protein spectra pointed out as characteristics the frequencies assigned to N—H, C=O, and —CO—NH—bonds. In nucleic acids, frequencies that may characterize C—N, C=N, P—O, and C—O bonds are evidenced.

The irradiation of these polyelectrolytic biomacromolecules with doses of ^{60}Co gamma rays in the range of 2×10^6R or 1.1×10^{20} eV/g, results in some changes in the intensity of their corresponding characteristic lines.

Results indicate the existence of a different radiosensitivity to the action of gamma irradiation of biopolyelectrolytes. This sensitivity decreases in the following ordr : albumin, gamma-globulin, DNA and RNA.

ST. CERC. BIOCHIM., 12, 3, 245–250 (1969)

DATE CU PRIVIRE LA ACTIVITATEA REDUCTAZELOR PULMONARE ÎN SILICOZA EXPERIMENTALĂ LA ŞOBOLAN

SILVIA GABOR, T. FRITS, B. BÖHM şi AURELIA COAŞAN

Rezumat. — Activitatea reductazei pulmonare la animale (şobolani) cu silicoză experimentală a fost urmărită cu ajutorul metodei de reducere cu trifeniltetrazoliu (experienţele au fost efectuate pe plămîni izolaţi şi perfuzaţi timp de 30 min cu o soluţie Van Dyke-Hastings, care conţine 1% trifeniltetrazoliu) şi prin determinarea conţinutului în glutation şi a grupărilor —SS şi —SH.
Rezultatele obţinute arată o scădere de 28,5% a activităţii tetrazoliu-reductazei pulmonare în silicoză, ca şi o scădere a raportului —SS/—SH (3,32 la animalele de control şi 2,14 la cele cu silicoză), conţinutul în glutation redus rămînînd neschimbat.

Este cunoscut faptul că în cadrul efectelor sale citotoxice, bioxidul de siliciu afectează unele sisteme enzimatice de dehidrogenare, precum şi cofactorii implicaţi în transferul de hidrogen [1], [2], [3]. S-a semnalat, de asemenea, că bioxidul de siliciu blochează grupările tiolice libere în general şi, ca atare, şi glutationul redus [4]. Ca urmare a agresivităţii SiO_2, este afectat metabolismul propriu al parenchimului pulmonar, prezentînd, în particular, modificări ale metabolismului lipidic, cărora unii autori le acordă o importanţă aparte în patogeneza silicozei. Pe de altă parte, este ştiut că metabolismul lipidic pulmonar se desfăşoară cu o intensitate apreciabilă, caracteristică, interesînd, în egală măsură, atît procesele catabolice, cît şi pe cele de sinteză a lanţurilor de acizi graşi. Sinteza *de novo* a acizilor graşi necesită însă un aport însemnat de hidrogen, rezultat din procesele multiple de dehidrogenare şi transportat prin agenţi intermediari de transfer pînă la sistemele enzimatice care catalizează procesele de reducere a radicalilor acetil.

Plecînd de la aceste consideraţii şi avînd în vedere că activitatea reductazelor pulmonare în silicoză n-a fost studiată decît pe omogenate pulmonare sau pe culturi de macrofage şi fibroblaşti (puse în contact cu particule de SiO_2), deci în condiţii cu totul artificiale [1], [6], ne-am propus, pentru a fi mai aproape de realitate şi a obţine date mai convingătoare, să reluăm problema cu ajutorul unei metode de lucru mai adecvate, lucrînd pe plămîni întregi şi păstrîndu-se astfel integritatea anatomică şi histologică. În acest sens, am urmărit starea de activitate a tetrazoliu-reductazelor şi, în paralel, am determinat conţinutul în grupări tiol şi ditiol, precum şi conţinutul în glutation al plămînilor silicozaţi.

METODA

A. Determinarea activităţii reductazelor pe plămîn izolat de şobolan. Determinările au fost făcute pe două loturi de şobolani: un lot martor (10 animale) şi un lot silicotic (10 animale), greutatea corporală a animalelor fiind de 220—250 g. Silicozarea animalelor s-a făcut prin instilarea intratraheală a 40 mg cuarţ (conţinînd peste 99% SiO_2 liber) în suspensie de ser fiziologic (mărimea particulelor: 2—5 μ). La 8—9 luni după administrarea cuarţului, animalele au fost sacrificate prin exsanguinare (secţionînd aorta abdominală). După sacrificare, se deschide larg cutia toracică şi se îndepărtează plastronul sterno-costal; apoi se spală reţeaua vasculară pulmonară de sîngele ce a mai rămas în ea, injectînd în artera pulmonară o cantitate de soluţie salină izotonică (10—15 ml), şi se aşază sub plămîni un mic lambou de polietilenă, pentru a-i feri de lezarea prin vîrful coastelor secţionate. Se incizează traheea, iar prin butoniera formată se introduce o canulă de sticlă legată de o seringă de 10 ml, umplută cu soluţie Van Dyke-Hastings, conţinînd glucoză (0,1 g%) şi trifeniltetrazoliu în proporţie de 1%. După aspirarea aerului, plămînii se umplu cu această soluţie; pentru a asigura umplerea alveolelor cu lichid, se scoate prin aspirare cu seringa lichidul introdus în plămîni, apoi se reumple; această operaţie se repetă de 3—4 ori şi apoi se leagă strîns traheea sub canulă. După secţionarea traheii, deasupra ligaturii, plămînii se scot din cutia toracică şi (după îndepărtarea inimii) se aşază în termostat, la 37°C, timp de 30 min. După terminarea incubării, se secţionează traheea, pentru a face să iasă excesul de lichid; lichidul ce a mai rămas în plămîni se îndepărtează comprimînd plămînii între două plăci de sticlă. După cîntărire, plămînii se triturează cu acetonă, pentru a extrage formazanul produs; pentru a asigura o extracţie totală, se folosesc 20 ml acetonă de fiecare gram de plămîn; cu acest volum total de solvent se fac 5 extracţii. Extractele unite se centrifughează şi se colorimetrează (spectrofotometru) contra unei soluţii standard de formazan. Rezultatele obţinute se exprimă în mg tetrazoliu redus la 1 g plămîn umed în timp de 1/2 oră.

Observaţii. *a*) Este necesar ca în timpul umplerii plămînilor cu soluţia salină să se lucreze cu atenţie, pentru a feri plămînii de lezare prin capetele coastelor. *b*) Vesela folosită va fi decapată cu acid sulfocromic. *c*) Deşi traheea a fost legată, o parte din lichidul introdus în plămîni va ieşi; aceasta se datoreşte faptului că, plămînii fiind supraumpluţi, ia naştere un curent de lichid ce traversează epiteliul alveolar, trece în interstiţiul pulmonar şi de aici se filtrează în capilare, de unde se scurge prin venele pulmonare. Acest fenomen este foarte avantajos, căci asigură o reîmprospătare continuă a soluţiei saline în intimitatea ţesuturilor şi, prin aceasta, se realizează un aport permanent şi continuu de glucoză şi de tetrazoliu; în acelaşi timp, se asigură şi îndepărtarea produşilor de degradare metabolică.

B. Determinarea grupărilor tiolice libere ale parenchimului pulmonar. Plămînii au fost omogenizaţi (Potter) cu o soluţie molară de fosfat monosodic (5 ml la 1 g organ), iar omogenatul obţinut a fost centrifugat (3000 de turaţii, timp de 10 mîn). Determinările au fost făcute pe super-

natant. Dozarea grupărilor tiolice s-a făcut cu metoda amperometrică, folosindu-se nitrat de argint pentru titrare [7], iar valorile găsite au fost exprimate în micromoli de glutation şi raportate la 1 g plămîn umed.

Dozarea grupărilor disulfurice s-a efectuat cu aceeaşi metodă, după reducerea lor prealabilă cu sulfit de amoniu (1%).

C. Dozarea glutationului redus.

S-a folosit metoda lui Kay şi Murfitt cu alloxan [8], citirile făcîndu-se la spectofotometru (305 mμ).

REZULTATE

A. În ceea ce priveşte activitatea reductazelor pulmonare, am obţinut următoarele rezultate. În cazul lotului silicotic, valoarea medie a cantităţii de trifeniltetrazoliu redus a fost găsită de 19,4 mg ($\sigma = 0{,}042$) pe 100 g plămîn umed (după o incubare de 30 min), iar la lotul martor cantitatea de trifeniltetrazoliu redus era de 27,1 mg% ($\sigma = 0{,}031$). Diferenţa dintre aceste valori este statistic distinct semnificativă ($p < 0{,}01$). Prin urmare, ritmul de reducere enzimatică a tetrazoliului prezintă o scădere în silicoză. Legat de această concluzie, menţionăm că rezultatul concordă cu constatările histochimice (estimative) făcute pe culturi de macrofagi pulmonari şi peritoneali, fibroblaşti [6], [9] şi pe felii de plămîni [5].

Pe marginea acestui subiect este oportun a se face unele observaţii cu privire la semnificaţia acestui rezultat. De fapt, procesul de reducere enzimatică a trifeniltetrazoliului şi formarea formazanului reflectă activitatea mai multor sisteme enzimatice de dehidrogenare-reducere şi, în consecinţă, hidrogenul ce se fixează pe tetrazoliu poate proveni din mai multe surse [10] şi poate fi transportat pe mai multe căi pînă la acceptorul final de hidrogen, care în cazul nostru este trifeniltetrazoliul. Mecanismul intim al formării de formazan nu este încă lămurit şi variază, desigur, de la un sistem la altul. Astfel, bunăoară, succindehidrogenazele ar putea preda direct hidrogenul tetrazoliului, fără să necesite vreun coferment.

În schimb, dehidrogenazele lactice şi malicodehidrogenaza nu pot ceda direct hidrogenul tetrazoliului, ci numai prin intermediul NAD-ului [10], [11]. Se cunoaşte, de altfel, că metabolismul hidrogenului este un fenomen complex, prezentînd o diversitate remarcabilă de căi metabolice. Cu toate acestea, se pot defini trei termeni generali, de orientare, în ceea ce priveşte căile metabolice ale acestui element: dehidrogenarea — transport — reducere (termen final).

În lumina acestei scheme, se pune întrebarea căreia dintre aceste etape i se datoreşte scăderea ritmului de reducere a tetrazoliului în parenchimul pulmonar silicotic. Sub acest raport, putem menţiona că a fost semnalat de mai mulţi autori că bioxidul de siliciu *in vitro* inhibă activitatea mai multor dehidrogenaze [2], [6], [9]. Este deci posibil ca scăderea ritmului de reducere a tetrazoliului să fie consecinţa unui deficit

de aport de hidrogen, ca urmare a scăderii ritmului dehidrogenărilor. În legătură cu acest subiect avem de ținut cont de faptul că și în condiții normale (organe sănătoase) nu întreaga cantitate de hidrogen disponibil se transferă tetrazoliului, ci, concomitent, o parte se transferă prin diverși transportori, cum ar fi NAD (NADP), GSSG sau legăturile —SS— ale protidelor [12], acidul ascorbic, pentru alte procese de reducere (de exemplu pentru sinteza acizilor grași, pentru reducerea acidului piruvic în lactic etc.). Este deci posibil ca, în silicoză, din cauza unor perturbări în procesul de transfer, o cantitate mai redusă de hidrogen să fie orientată spre reducerea tetrazoliului, restul fiind dirijat spre alte căi metabolice, servind la alte procese de reducere. Într-adevăr, unii autori admit existența unor vicii de transfer de hidrogen în silicoză [2], [3], [13].

B. Conținutul de grupări tiolice libere și grupări disulfurice ale parenchimului pulmonar în silicoză.

Este cunoscut faptul că bioxidul de siliciu poate bloca grupările tiolice prin formarea de legături de hidrogen cu substratul [14]. În acest sens, menționăm că s-a semnalat scăderea conținutului în grupări —SH al hematiilor [15] și al unor fracțiuni proteice din ser [4] la bolnavii de silicoză și, invers, unele substanțe (ca polivinil —N → O și altele) cu efecte favorabile (de moderare) asupra evoluției silicozei au proprietatea de a intra în combinație cu SiO_2 [14]. Având în vedere interesul ce se acordă cunoașterii în general a modificărilor proceselor de reducere, care pot surveni în silicoză și, în special, a celor ce afectează compușii cu conținut de sulf, am determinat conținutul în grupări —SH și —SS— al parenchimului pulmonar, raportul lor oglindind activitatea tioreductazelor.

Tabela 1

Conținutul în grupări —SH și —SS— al plămînilor (șobolan)

		— SH	— SS —	Raportul SH : SS
		Valorile medii (μM) pentru 1 g plămîn umed		
Martor (13 animale)		2,20±0,13	0,71±0,04	3,32±0,40
Silicoză	3 luni (8 animale)	2,13±0,32	0,92±0,15	2,55±0,40
	6 luni (11 animale)	2,00±0,10	0,78±0,04	2,35±0,13*
	9 luni (12 animale)	1,77±0,14*	1,00±0,11*	2,17±0,44*

Determinările au fost făcute pe șobolani silicozați de 8—9 luni. În același timp, am mai făcut determinări și pe loturi de animale la termene mai scurte după administrarea silicei (la 3 luni și la 6 luni), cu scopul de a cunoaște modul cum acest parametru biochimic evoluează în cursul procesului de constituire a silicozei. Datele obținute sînt rezumate în tabela 1.

Din datele obținute rezultă că în etapa de silicoză constituită (9 luni) asistăm la o creștere moderată a conținutului în grupări —SS— (statistic semnificativă) și, concomitent, la o scădere a grupărilor —SH (semnificativă); raportul SH : SS scade semnificativ. Sub raport evolutiv, această tendință se remarcă și în etapele mai timpurii ale procesului de silicozare, raportul dintre acești doi parametri cîștigînd o semnificație deja la 6 luni după administrarea silicei. Pe marginea acestui rezultat se poate trage concluzia că în silicoză are loc o deplasare a echilibrului catalitic dintre grupările tiolice și cele disulfurice pulmonare în favoarea acestora din urmă, ca o consecință probabilă a scăderii ritmului proceselor de reducere a grupărilor —SS—. Comparînd acest rezultat cu cel precedent, rezultă că tioreductazele pulmonare sînt coafectate în silicoză în mod similar ca și tretrazoliu-reductazele.

În ceea ce privește conținutul în glutation redus al plămînilor, am înregistrat următoarele valori : *a*) 71,85 micrograme (σ=12,50) pe 1 gram plămîn umed la lotul de animale martor (media de la 10 animale) și *b*) 70,15 micrograme (σ=4,74) pe 1 gram plămîn umed la lotul silicotic (10 animale). Deci conținutul în SHG al plămînului silicotic este normal, spre deosebire de conținutul în grupări —SH al altor constituenți.

Prezentată la redacție la
4 octombrie 1968

Institutul de igienă,
Secția Igiena muncii și boli profesionale,
Cluj

BIBLIOGRAFIE

1. B. Barhad, I. Goldstein, L. Petrescu, G. Rotaru, V. David, Med. Lavoro, **57**, 579 (1966).
2. Maria Breyer, Kilroe Smith, Brit. J. industr. Med., **21**, 32 (1964).
3. H. Daniel-Moussard, C.R. Soc. Biol., **155**, 699 (1961).
4. O. S. Garkavenko, N. U. Ulmarova, Ghigh. Trud., **12**, 27 (1966).
5. N. T. Raikhlin, I. M. Schneidman, Bull. eks. biol. i med., **10**, 112 (1965).
6. B. Rasche, W. T. Ulmer, Int. Arch. Gewerbepath. Gewerbehyg., **21**, 39 (1965).
7. V.O. Belitser, O. V. Lebachevskaya, Ukrain. Biochim. Zhur., **31**, 587 (1959).
8. W. W. Kay, K. C. Murfitt, Biochem. J., **74**, 203 (1960).
9. E. C. Vigliani, B. Pernis, L. Monaco, *Inhaled Particles and Vapours*, sub red. C. N. Davis, Pergamon Press, Oxford (1961).
10. S. Sugawara, E. S. E. Hafez, Proc. Soc. exp. Biol. Med., **126**, 849 (1967).
11. T. Barka, *Kiserl. Orvostudomany Vizsg, Mdsz*, vol. **5**, Akademia Kiado Budapesta, 1959, 367.
12. J. S. Harrington, Medical Proc. M.B., **13**, 574 (1967).
13. T. Frits, S. Gabor, Z. Anca, Med. Lavoro, **58**, 422 (1967).
14. T. Nash, A. C. Allison, J. S. Havington, Nature (Lond.), **210**, 259 (1966).
15. A. N. Cesaro, A. Granata, A. Germano, Arch. Mal. prof., **25**, 97 (1964).

SOME DATA ON THE PULMONARY REDUCTASE ACTIVITY IN THE EXPERIMENTAL SILICOSIS IN RATS

SUMMARY

The pulmonary reductase activity in animals (rats) with experimental silicosis was followed by using the triphenyltetrazolium reduction method (the experiments being carried out on whole lungs, isolated and perfused for 30 minutes with a Van Dyke-Hastings solution, containing 1% triphenyltetrasolium) and by determining the glutathion content and the —SS— and —SH groups.

Results obtained show a 28,5% reduction in the tetrazolium-reductase activity in the silicotic lungs, as well as a reduction in the ratio —SS/—SH (3.32 in the control animals, and 2.14 in the silicotic ones), the reduced glutathion content remaining unchanged.

ST. CERC. BIOCHIM., 12, 3, 251–264 (1969)

CAPTAREA ŞI DEGRADAREA INTRACELULARĂ A IMUNOGLOBULINEI G DE IEPURE DE CĂTRE LEUCOCITELE POLIMORFONUCLEARE IZOLATE DIN LICHIDUL PERITONEAL DE COBAI

VICTOR GHEŢIE şi ANDREI SULICA *

Rezumat. — Leucocite PMN izolate din exsudat peritoneal de cobai au fost incubate cu IgG de iepure, dublu marcată cu I^{131} şi izotiocianat de fluoresceină. S-a stabilit că cantitatea de IgG fixată de o celulă este de ordinul 10^7 molecule/celulă; această cantitate variază direct proporţional cu concentraţia proteinei şi invers proporţional cu concentraţia celulară.

IgG fixată a fost distribuită în toate fracţiunile subcelulare examinate (920 × g, 8 200 × g, 21 500 × g şi „supernatant"), procentul cel mai mare fiind asociat cu fracţiunea 8 200 × g, care conţine „granulele" leucocitare. La acest nivel, IgG a fost hidrolizată pînă la stadiul de fragmente Fab; fragmentul Fc şi peptidele radioactive solubile în acid tricloracetic nu au fost evidenţiate.

Acţiunea fracţiunii „granulare" este identică şi *in vitro*, această concluzie fiind obţinută prin incubarea ei cu IgG. Se evidenţiază numai fragmentele Fab, deşi cu alte fracţiuni subcelulare se produc şi fragmentele Fc.

În lucrări recente am arătat că imunoglobulina G (IgG) de iepure poate fi degradată *in vitro* de către unele fracţiuni subcelulare din splină şi din mucoasa intestinală pînă la stadiul unor fragmente de hidroliză similare cu acelea pe care le produce papaina [1], [2]. Aceste rezultate sugerează că un proces asemănător ar putea avea loc şi în celule, sub acţiunea catepsinelor lizozomiale, şi că fragmente de tip Fab şi Fc ar putea deci exista în mod normal în celulele care degradează IgG.

În lucrarea prezentă am încercat să aducem o dovadă experimentală directă că scindarea IgG poate să aibă loc în celula intactă. De aceea, am urmărit soarta intracelulară a proteinei după încorporarea ei în celule, căutînd să punem în evidenţă produşi de degradare ai IgG. În acelaşi timp, am încercat să obţinem date cantitative asupra procesului de captare, determinînd cantitatea de IgG care poate fi fixată de o celulă, în corelaţie cu factorii care controlează acest proces.

* Adresa prezentă: Institutul de medicină legală — Laboratorul de genetică moleculară, Bucureşti, str. Căuzaşi nr. 9.

MATERIAL ȘI METODĂ

Prepararea și dubla marcare a IgG. S-a pornit de la un amestec de seruri de iepure, din care s-a obținut IgG pură prin precipitare cu $(NH_4)_2\ SO_4$ 33% și cromatografie pe DEAE—celuloză [3]. Puritatea preparatului a fost controlată prin imunodifuzie cu un ser imun de porc antiser de iepure (Sevac, Praga).

Radioiodurarea s-a făcut cu $Na^{131}I$, fără purtător (I.F.A., București, activitate specifică 10—15 mCi/ml), utilizînd tehnica oxidării cu azotit, în tampon carbonat pH 9,2, 0,2 M [4]. S-a adăugat atîta purtător cît să se fixeze aproximativ 6 atomi iod/mol IgG. Iodul liber s-a îndepărtat prin gel-filtrare pe Sephadex G-25; eluția s-a făcut cu tampon carbonat pH 9,2, 0,1 M.

Soluția de IgG radioactivă s-a concentrat prin perevaporare pînă la jumătate din volumul inițial, cînd concentrația proteică devine 1,5—2 %, iar tamponul carbonat atinge o molaritate de 0,2. S-a adăugat apoi izotiocianat de fluoresceină (Serva), în proporție de 1 mg la 20 mg proteină, și s-a lăsat amestecul 16 ore la +4°C. Excesul de fluorocrom s-a îndepărtat prin gel-filtrare pe Sephadex G-25; eluția s-a făcut cu o soluție salină tamponată la pH 7,2—7,3 cu tampon Sörensen (SST).

Soluția de IgG a avut o activitate specifică ce a variat între 2 și 4 μCi/mg proteină și o radioactivitate liberă, neprecipitabilă cu acid tricloracetic 10%, mai mică de 1%. Soluția nu conține fluorocrom liber, decelabil prin electroforeză. IgG dublu marcată (IgG*) păstrează o capacitate de a reacționa cu seruri imune specifice identică cu cea a proteinei intacte, cu deosebire că mobilitatea ei electroforetică este crescută în urma fixării fluorocromului în moleculă [5].

Hidroliza cu papainăa IgG. S-a hidrolizat cu papainăa (3 × cryst., N.B.Co) la pH 7,0 [6] și 5,5 [7] IgG fluorescentă, dar neradioactivă. Preparatele s-au dializat peste noapte față de apă distilată și s-au liofilizat. Dintr-o IgG nemarcată s-au preparat fragmentele Fab și Fc, prin hidroliză cu papainăa la pH 7,0 și cromatografie pe CM-celuloză [6].

Electroforeza, imunoelectroforeza și autoradiografia. Electroforeza a durat 2 ore la un potențial de 6 V/cm, în tampon barbital pH 8,6, μ = = 0,05 (în plăci) și 0,016 (în gel). S-a utilizat un gel de agaroză 1%, în plăci de 7/4 cm.

Pentru imunoelectroforeză s-au utilizat serurile imune: cobai anti-IgG, capră anti-Fc (ser ce conține și anticorpi față de fragmentul Fab), obținut prin bunăvoința dr. M. Waldesbühl de la Institutul de biochimie din Lausanne, și porc anti (Fab+Fc), preparat prin injectarea repetată a unui animal cu un amestec de fragmente Fab (redus la alchilat) și Fc în asociație cu gel de aluminiu. Serul imun a fost preparat de dr. N. St. Chișiu de la Spitalul „Dr. I. Cantacuzino" din București, căruia îi mulțumim pe această cale. Reacțiile de identificare a unor linii de precipitare s-au făcut cu ajutorul fragmentelor Fab și Fc și al hidrolizatului de IgG fluorescentă cu papainăa la pH 5,5.

Măsurarea radioactivității. S-au utilizat un contor Geiger-Müller tip clopot, cu fereastră subțire, pentru măsurarea radioactivității în probe alicote de 0,1 ml, și un contor de scintilație cu puț, pentru determinarea

radioactivității în probele globale. S-au făcut corecțiile pentru autoabsorbție și timpul de înjumătățire al radioizotopului.

Recoltarea leucocitelor polimorfonucleare (PMN). S-au injectat intraperitoneal cobai cu 30 ml dintr-o soluție sterilă de polivinilpirolidonă 5% în SST [8]. După 24 de ore s-a repetat tratamentul, iar după alte 2 ore lichidul peritoneal s-a colectat, cu un ac gros, într-o soluție Alsever. Lichidele hemoragice au fost îndepărtate. S-au spălat apoi celulele de 3 ori cu SST, aplicînd o forță centrifugală de 500 g, timp de 5 min. Dacă depozitul a conținut urme vizibile de eritrocite, acestea s-au distrus printr-un șoc osmotic de 10 s cu apă distilată, după care s-a introdus imediat un volum de 10 ori mai mare de SST și s-a repetat spălarea.

Celulele s-au resuspendat în SST; s-a făcut o numărare de celule, s-a determinat procentul de PMN din populația celulară (80%) și s-a stabilit viabilitatea celulelor cu eozină ($>90\%$).

S-au utilizat suspensii celulare obținute prin amestecarea lichidelor peritoneale de la 5—10 cobai, precum și celule provenite de la cîte un animal. Suspensia celulară a fost utilizată imediat după preparare.

Incubarea PMN cu IgG dublu marcată (IgG).* Celulele, în diluția dorită (10^7—10^8 celule/ml), s-au repartizat, în duplicat, în eprubete de centrifugă. Peste un volum de 1,5—1,7 ml s-au introdus 0,3—0,5 ml soluție de IgG* ce conținea 4 mg proteină radioactivă, în afara cazurilor specificate la rezultate. După o scurtă amestecare, s-a determinat radioactivitatea soluției (radioactivitate totală). S-au incubat probele la 37°C, efectuîndu-se o agitare intermitentă. După o oră, probele s-au centrifugat la 500 g, timp de 5 min, iar depozitele de celule s-au spălat de 6—8 ori cu SST. Pentru controlul spălării s-au luat probe din lichidul de spălare și s-a determinat radioactivitatea lor.

Depozitele de celule spălate s-au reluat în volume determinate de SST și s-a măsurat radioactivitatea lor (radioactivitatea legată de celule). În această suspensie de celule s-a determinat apoi numărul de celule existent, pentru a controla dacă în cursul spălării nu s-a pierdut material și s-a determinat din nou viabilitatea celulară cu eozină ($>90\%$).

Pentru cercetarea distribuției intracelulare a IgG* încorporate s-au utilizat cantități de 10 ori mai mari decît cele arătate mai sus.

Microscopia în ultraviolet și determinarea indicelui de pinocitoză. În suspensiile de celule spălate s-a determinat numărul de celule care devin fluorescente în urma incubării cu IgG*, în raport cu un număr total de 100—200 de celule numărate. Din aceste valori s-a calculat indicele de pinocitoză, adică procentrul de celule care fixează IgG*.

Pentru decelarea microscopică a fluorescenței în celule s-au folosit preparate proaspete, examinate între lamă și lamelă, imediat ce spălarea celulelor era terminată.

Repartizarea intracelulară a IgG.* Celulele spălate, care au fixat IgG*, s-au prelucrat în două feluri:

a) S-au suspendat celulele într-un volum mic de apă distilată ce conținea 0,01 M iodacetamidă (0,3 ml pentru 10^7 celule) și s-au înghețat-dezghețat de 3 ori între —35 și +37°C. S-a centrifugat apoi la 20 000 × g, timp de 15 min, la +4°C. Într-o porțiune a supernatantului s-a determinat cu o soluție de acid tricloracetic 10% radioactivitatea legată de proteine, iar restul soluției s-a analizat electroforetic și imunoelectroforetic,

după o concentrare prealabilă prin perevaporare. Distrugerea integrității celulare s-a făcut în unele cazuri și cu o soluție de dezoxicolat de sodiu 0,4% sau prin ultrasonicare.

b) S-au suspendat celulele într-o soluție de zaharoză 0,25 M, rece ca gheața, ce conținea și 0,01 M iodacetamidă (aproximativ 1,0 ml pentru 10^7 celule) și s-a omogenizat cu un omogenizator Potter-Elvehjem cu piston de teflon, pînă cînd s-a constatat microscopic că cea mai mare parte din celule este distrusă (aproximativ 10 min). S-a centrifugat apoi la 920 × g (10 min), 8 200 × g (10 min) și 21 500 × g (30 min). Toate operațiile s-au efectuat la +4°C.

Depozitele s-au reluat într-un volum determinat de zaharoză 0,25 M și s-a măsurat radioactivitatea lor. Fracțiunea de 8 200 × g a fost recentrifugată, s-a suspendat în apă distilată ce conținea iodacetamidă 0,01 M și a fost înghețată-dezghețată de 3 ori. S-a centrifugat apoi la 20 000 × g, 10 min, la +4°C, iar supernatantul s-a analizat imunoelectroforetic după o concentrare prealabilă prin perevaporare.

Incubarea IgG și IgG nemarcate cu fracțiuni subcelulare izolate din PMN.* Din celule netratate s-au preparat, prin centrifugare fracționată în mediu de zaharoză 0,25 M [9], [10], următoarele fracțiuni subcelulare: 920 × g (10 min), 8 200 × g (10 min), 21 500 × g (30 min) și „supernatant".

Depozitele s-au suspendat în tampon citrat pH 3,5, 0,1 M, în volume proporționale cu cantitatea depozitelor. S-au împărțit volumele în două părți; la o parte s-a adăugat IgG*, iar la cealaltă parte IgG nemarcată (3—5 mg/ml suspensie). S-au incubat amestecurile la 37°C, timp de 14 ore, în prezența a 1—2 picături de toluen. S-a adus pH-ul amestecurilor la 8,0 cu soluție de NaOH 0,5 N și apoi ele s-au centrifugat la 20 000 × g timp de 15 min. Supernatantul s-a analizat imunoelectroforetic.

Martorii s-au preparat la fel, cu singura deosebire că imediat după adăugarea IgG pH-ul amestecului s-a adus la 8,0.

Gel-filtrarea pe Sephadex G-150. S-au amestecat supernatantele rezultate prin incubarea IgG* cu fracțiunile subcelulare izolate. S-au dizolvat în acest amestec 20 mg IgG nemarcată și 10 mg fragmente Fab + Fc. Soluția s-a dializat peste noapte față de tampon Tris-HCl pH 8,0, 0,2 M și apoi s-a trecut peste o coloană 90/2 de Sephadex G-150, echilibrată cu același tampon. S-au colectat fracțiuni de 4 ml, în care s-a determinat densitatea optică la 280 nm și s-a măsurat radioactivitatea.

Exprimarea rezultatelor. Numărul de molecule fixat de o celulă a fost calculat cu formula $\frac{QR_cN}{R_tGMN_c}$, în care: Q = cantitatea de IgG* introdusă (în g); R_c = radioactivitatea legată de celule (p/m); N = numărul lui Avogadro ($6 \cdot 10^{23}$); R_t = radioactivitatea totală a amestecului (p/m); GM = greutatea moleculară a IgG de iepure ($1{,}5 \cdot 10^5$); N_c = numărul de celule din amestec care fixează IgG *. Ultimul parametru s-a calculat din relația: $N_c = \frac{1}{100}$ indice de pinocitoză × numărul total de celule.

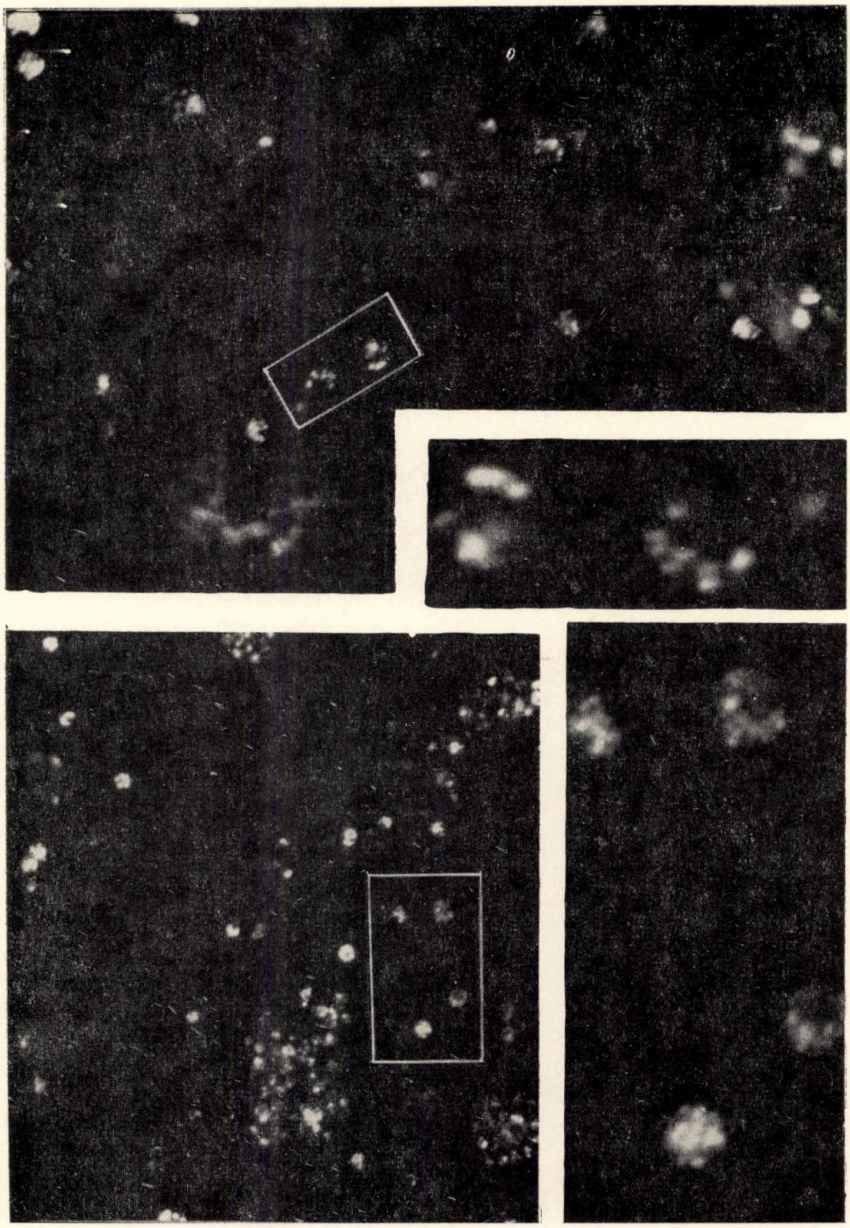


Fig. 2. — Captarea IgG* de către leucocitele PMN (fluorescența este în granule mici, răspîndită în citoplasmă, dar nu și în nucleu) (× 140).

REZULTATE

Pentru a atinge o radioactivitate constantă în lichidul de spălare al celulelor incubate cu IgG* sînt necesare 6—8 spălări (fig. 1). Radioactivitatea care mai poate fi îndepărtată prin mărirea numărului de spălări este sub 1% din aceea care rămîne ferm legată de celule.

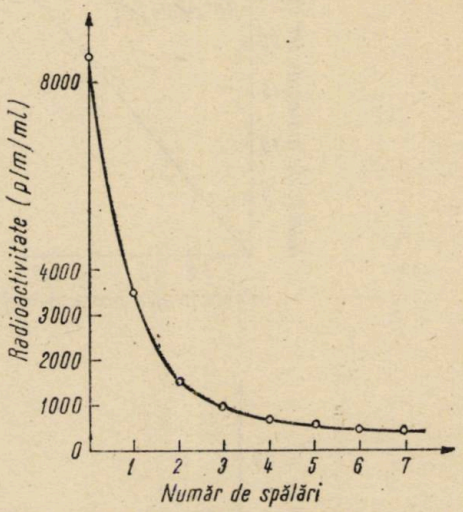


Fig. 1. — Scăderea radioactivităţii fixate de celule în urma spălării lor.

Din radioactivitatea legată de celule, o parte este reprezentată de IgG* adsorbită ireversibil de celule, dar cea mai mare parte o constituie IgG* încorporată în celule. Distrugînd integritatea celulară, prin îngheţare-dezgheţare sau prin ultrasonicare, în SST, se constată că aproximativ 80% din radioactivitatea iniţială trece în soluţie, ceea ce arată că cel puţin acest procent din radioactivitatea totală este încorporat în celule. Nu este însă exclus că această valoare să fie în realitate mai mare, deoarece o parte din IgG* încorporată şi extrasă poate fi readsorbită pe membranele şi resturile celulare care apar în urma dezintegrării celulare.

Prezenţa IgG* în celule s-a evidenţiat prin microscopie în UV. S-a observat că majoritatea celulelor examinate prezentau o fluorescenţă în interiorul celulei, în zona perinucleară (fig. 2).

Distribuirea fluorescenţei nu a fost identică la toate celulele examinate (fig. 2), ceea ce sugerează că s-au surprins momente diferite ale procesului de pinocitoză. Este de remarcat că nu s-au observat celule cu membrana fluorescentă, ceea ce arată că cantitatea de IgG* adsorbită pe suprafaţa celulelor este mult mai mică decît cantitatea încorporată şi se găseşte sub limita de sensibilitate a metodei de microscopie în UV.

Aceste experienţe sugerează că nu întreaga cantitate de IgG* fixată trebuie considerată ca încorporată în celule. Deci, cantitatea de IgG încorporată în celule, determinată de noi, este în realitate mai mică; deşi n-am calculat cantitatea de IgG* fixată prin adsorbţie ireversibilă, considerăm că ea este suficient de mică pentru a nu schimba semnificaţia rezultatelor noastre.

Captarea IgG* în leucocitele PMN a fost studiată în raport cu doi parametri: concentraţia proteică şi concentraţia celulelor. Rezultatele sînt înfăţişate în figurile 3 şi 4.

Se observă că numărul moleculelor captate de o celulă variază liniar cu creşterea concentraţiei proteice, ceea ce arată că în limitele studiate de noi nu se manifestă un fenomen de saturare.

Urmărind variația acestui număr în funcție de concentrația celulelor, se constată că o dată cu creșterea acesteia din urmă numărul moleculelor

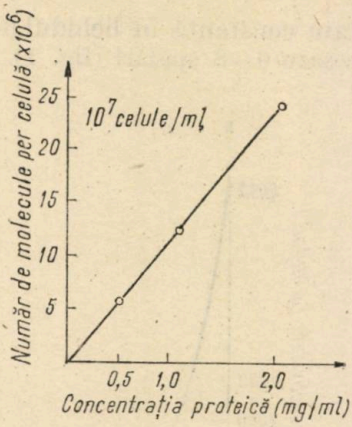


Fig. 3. — Dependența încorporării IgG* în celule de concentrația proteică.
Pe ordonată s-a reprezentat numărul de molecule care este fixat de o celulă care încorporează, deci s-au exclus din calcule celulele care nu fixează IgG*. Valoarea 10^7 celule/ml reprezintă numărul de celule care încorporează IgG și nu numărul total de celule din amestec.

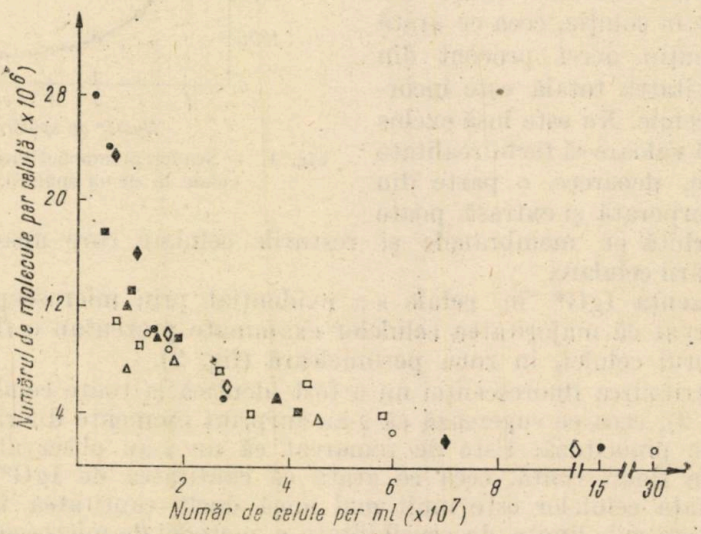


Fig. 4. — Dependența încorporării IgG* în celule de concentrația celulelor.
Semnele figurează serii de experiențe diferite obținute cu celule provenite din lichide peritoneale amestecate, cu excepția celor notate ● și ○, care au fost obținute cu celule de la indivizi diferiți. Semnele albe reprezintă valorile exprimate în coordonatele: număr de molecule fixate care revine la o celulă (ordonata) și număr de celule într-un ml de amestec (abscisa). Semnele înnegrite reprezintă valori exprimate în coordonatele: număr de molecule fixate numai de celulele din amestec care încorporează (ordonata) și număr de celule care încorporează într-un ml de amestec (abscisa).

fixate de o celulă scade, indiferent dacă rezultatele se exprimă în sistemul de coordonate ce raportează concentrația tuturor celulelor din amestec la numărul de molecule care revine la o celulă sau în sistemul de coordo-

nate ce raportează concentrația celulelor care încorporează la numărul de molecule ce revine la o celulă care captează.

Această dependență are un raport de corelație de 0,77 cînd rezultatele se raportează la concentrația tuturor celulelor din amestec și de 0,70 cînd ele se raportează la concentrația celulelor care încorporează. Ambele raporturi de corelație sînt semnificative, iar diferența dintre ele nu este semnificativă, ceea ce arată că dependența dintre cele două variabile — numărul de molecule fixat și concentrația celulelor — nu este legată de felul în care se exprimă rezultatele.

Totuși, raportarea la numărul de celule care încorporează, și nu la numărul total de celule, era necesară, deoarece valorile găsite în primul caz sînt mai apropiate de realitate. Această exprimare apărea cu atît mai necesară, cu cît indicele de pinocitoză a variat considerabil de la experiență la experiență, într-un interval cuprins între 26,8 și 80,1%.

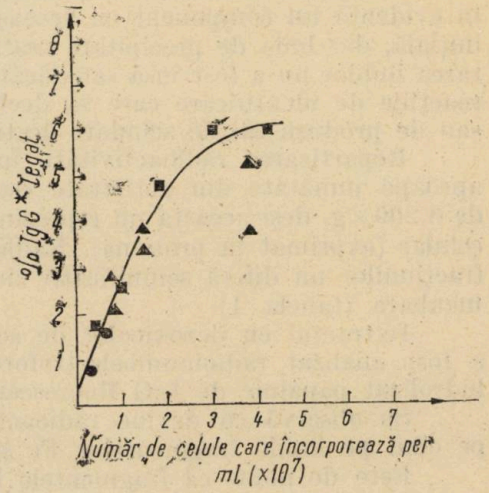


Fig. 5. — Variația procentului de IgG* încorporat cu concentrația celulelor.

Faptul că numărul de molecule încorporat de o celulă scade pe măsură ce concentrația celulelor crește se datorește împrejurării că procentul de IgG* încorporată nu crește proporțional cu concentrația celulelor (fig. 5). Se constată că procentul de IgG* încorporată nu se dublează o dată cu dublarea concentrației de celule.

Din figură se observă că procentul de încorporare nu poate fi măsurat corect decît în anumite limite ale concentrației celulelor. Sub o concentrație de 10^7 celule/ml, procentul de IgG * scade sub 1%, ceea ce face ca determinările să nu mai fie sigure. Pentru concentrații celulare mai mari de 10^8 celule/ml, datorită viscozității prea mari a suspensiei celulare, determinările sînt stînjenite și dau rezultate eronate.

Rezultatele arată deci că suspensiile celulare al căror număr de celule variază între 1 și $7 \cdot 10^7$ celule/ml fixează IgG * într-o proporție care variază între 3 și $15 \cdot 10^7$ molecule/celulă, ceea ce corespunde la $7{,}5-37{,}5 \cdot 10^{-7}$ μg IgG*/celulă. Nu trebuie scăpat însă din vedere că aceste valori sînt ceva mai mari decît cele reale, deoarece ele cuprind și IgG adsorbită ireversibil pe suprafața celulelor.

Cantitatea de proteină încorporată este suficient de mare pentru ca, reluînd celulele într-un volum mic de lichid, IgG* și produșii săi de degradare să se găsească într-o concentrație care să permită decelarea lor prin tehnicile de imunodifuzie.

În extractele apoase de leucocite PMN, radioactivitatea liberă reprezintă între 1,2 și 1,3%, valoare care nu diferă semnificativ de aceea a radioactivității libere din soluția de IgG* folosită la incubare (0,8—

0,9%). Acest fapt pare să indice că, în timpul de o oră cît a durat incubarea la 37°C și în cele 1,5—2 ore cît au durat spălările cu SST la temperatura camerei, IgG* nu s-a hidrolizat în cantitate semnificativă pînă la nivelul unor peptide solubile în acid tricloracetic.

Analizate electroforetic și imunoelectroforetic, aceste extracte pun în evidență un component cu aceeași mobilitate electroforetică ca IgG* inițială, dar linia de precipitare arată o tendință de clivare (fig. 6). Separarea liniilor nu a fost însă satisfăcătoare, astfel că nu s-au putut efectua reacțiile de identificare care să decidă dacă este vorba de IgG intactă sau de produșii săi de scindare de tip Fab și Fc.

Repartizarea radioactivității între fracțiunile subcelulare arată că aproape jumătate din activitate este prinsă de fracțiunea „granulară" de 8 200 × g, deși aceasta nu reprezintă mai mult de 10% din materialul celular (exprimat în proteină). Radioactivitatea liberă la nivelul tuturor fracțiunilor nu diferă semnificativ de cea a soluției de IgG* folosită la incubare (tabela 1).

Extractul cu dezoxicolat de sodiu 0,4% al fracțiunii de 8 200 × g a fost analizat radioimunoelectroforetic, după ce s-a dizolvat în el un hidrolizat papainic de IgG fluorescentă, ca purtător (fig. 7).

Se observă că devine radioactivă numai linia fragmentului Fab, pe cînd pe liniile fragmentelor Fc și F'c nu sînt radioactive.

Este de notat că fragmentele Fc și F'c obținute prin hidroliza cu papaină a IgG* sînt radioactive, semn că ^{131}I are o repartizare uniformă în molecula de IgG.

Tabela 1

Repartizarea radioactivității între fracțiunile subcelulare izolate din leucocitele PMN incubate cu IgG* de iepure

Fracțiunea	Radioactivitatea (%)	Proteina (%)	Radioactivitate liberă* (%)
920 × g	12,4	20,0	1,0
8 200 × g	46,4	9,8	1,3
21 500 × g	19,3	5,8	0,9
„supernatant"	21,9	64,4	1,1

* Radioactivitatea liberă a soluției de IgG* folosite la incubare a fost de 0,9 %.

Lipsa de radioactivitate a liniilor de precipitare corespunzătoare fragmentelor Fc și F'c poate fi interpretată fie în sensul că ele au fost hidrolizate mai avansat și că numai fragmentul Fab își păstrează integritatea antigenică, fie că concentrația fragmentelor Fc + F'c (care sînt într-o cantitate de două ori mai mică decît fragmentul Fab) este sub limita de sensibilitate a tehnicii autoradiografice.

Pentru a studia particularitățile acestei hidrolize, am recurs la incubarea *in vitro* a IgG cu fracțiunile subcelulare arătate mai sus, izolate din leucocite PMN netratate.

Scindarea IgG* de către fracțiunile subcelulare este redată în figura 8.

Se observă că fiecare formațiune subcelulară are efecte hidrolitice, distincte. Deoarece nu am dispus de fragmente Fab și Fc fluorescente, pure, nu am putut face reacții de identificare neechivoce. De aceea, denu-

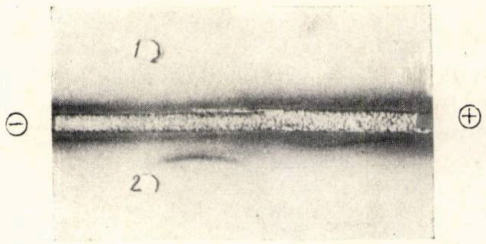


Fig. 6. — Analiza imunoelectroforetică a extractelor apoase obținute din leucocite PMN incubate cu IgG*.

1 — $4 \cdot 10^6$ molecule IgG* încorporate per celulă;
2 — $12 \cdot 10^6$ molecule IgG* încorporate per celulă.

Ser de cobai anti-IgG de iepure.

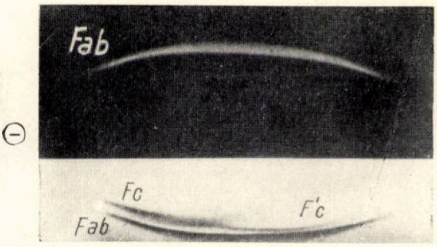


Fig. 7. — Analiza imunoelectroforetică a fracțiunii de 8 200 × g, izolată din leucocite PMN incubate cu IgG*.

1 — placă colorată; *2* — autoradiografie.

Ser de capră anti-Fc(+ Fab) de iepure.

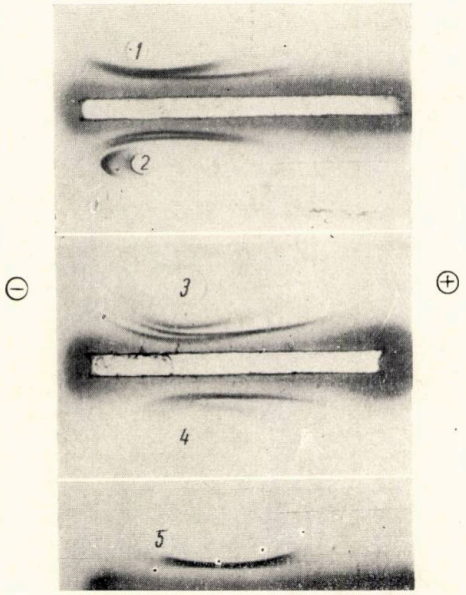


Fig. 8. — Analiza imunoelectroforetică a IgG* incubate cu unele formațiuni subcelulare izolate din leucocite PMN.

1 — 920 × g; *2* — 8 200 × g; *3* — 21 500 × g; *4* — „supernatant"; *5* — martor.

Ser de capră anti-Fc(+ Fab) de iepure.

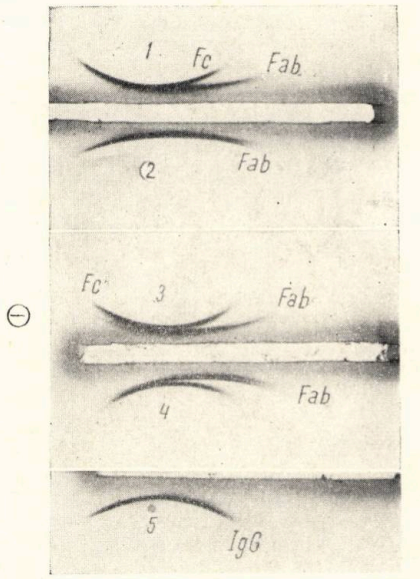


Fig. 9. — Analiza imunoelectroforetică a IgG incubate cu unele formațiuni subcelulare izolate din leucocite PMN.

1 — 920 × g; *2* — 8 200 × g; *3* — 21 500 × g; *4* — „supernatant"; *5* — martor.

Ser de capră anti-Fc (+ Fab) de iepure.

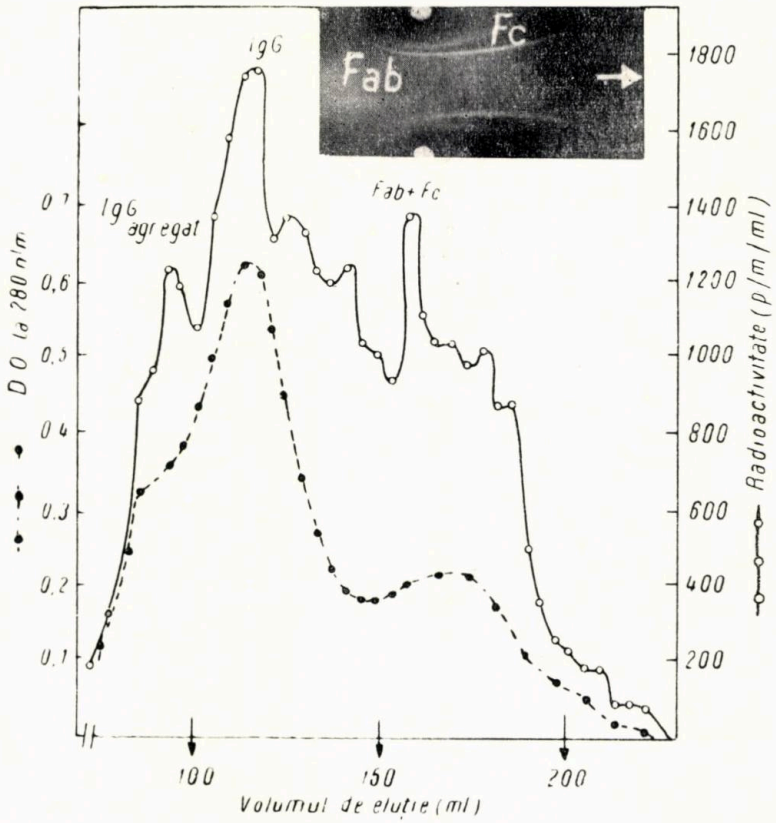


Fig. 10. — Analiza prin gel-filtrare pe Sephadex G—150 a IgG* incubate cu unele formațiuni subcelulare (s-au amestecat hidrolizatele de la fracțiunile de 920 × g, 8 200 × g și 21 500 × g). În partea de sus a figurii s-a cuprins și radioimunoelectroforegrama fracțiunilor de 21500 × g și „supernatant".

mirea liniilor este mai mult tentativă, şi anume : 920 × g (Fab şi Fc), 21 500 × g (Fab, Fc, şi F'c), supernatant (Fc, F'c şi probabil Fab). La fracţiunea de 8 200 × g se constată un aspect imunoelectroforetic deosebit, care nu permite nici măcar o identificare tentativă.

Identificarea sigură a fragmentelor de hidroliză la nivelul fracţiunilor subcelulare amintite s-a făcut utilizînd pentru incubare o IgG nemarcată (fig. 9).

Se observă că prin incubare cu fracţiunea de 8 200 × g nu se mai poate pune în evidenţă decît linia fragmentului Fab. Acest rezultat corespunde cu cel obţinut *in situ* şi pare a sugera că în celule, la acest nivel, ar putea avea loc o hidroliză mai avansată a fragmentelor Fc şi F'c, în timp ce fragmentul Fab s-ar menţine intact. În fracţiunile de 21 500 × g se constată prezenţa unei linii slabe, neidentificate, alături de cele ale fragmentelor Fc şi Fab. În fracţiunea „supernatant", pentru fragmentul Fab se obţin două linii de precipitare.

Prezenţa fragmentelor de hidroliză radioactive în incubatele de IgG* cu formaţiunile subcelulare a fost dovedită şi pe calea analizei lor prin gel-filtrare pe Sephadex G-150 (fig. 10).

Se observă prezenţa unui pisc radioactiv atît în volumul de eluţie al IgG, cît şi al fragmentelor sale de hidroliză. Eterogenitatea notabilă a piscului dat de fragmente arată că, în urma activităţii proteolitice a formaţiunilor, pot rezulta produşi cu greutate moleculară diferită. Prezenţa în cantitate însemnată a IgG* intacte arată că unele din liniile de precipitare redate în figura 8 ar putea fi puse pe socoteala prezenţei moleculei nehidrolizate în digeratele analizate.

DISCUŢII

Cantitatea de IgG* adsorbită ireversibil pe suprafaţa celulelor a fost considerată de noi neglijabilă în raport cu cantitatea încorporată. Deşi n-am adus dovezi experimentale directe, există cercetări care sînt în acord cu punctul nostru de vedere. Astfel, din datele lui H. Ryser şi colab. [11] se poate măsura cantitatea de albumină umană marcată cu ^{131}I, adsorbită ireversibil de celulele tumorale, la o concentraţie proteică asemănătoare cu cea folosită de noi ; se găseşte că ea reprezintă mai puţin de 10% din cantitatea totală fixată de o celulă. Un argument suplimentar este şi faptul că leucocitele PMN, spre deosebire de alte celule, ca macrofagele de exemplu, nu adsorb anticorpii citofili [12], deci afinitatea membranei lor pentru imunoglobuline pare a fi destul de scăzută.

Procentul relativ mare de IgG* care nu poate fi solubilizată prin ruperea celulelor (20%) poate fi determinat în parte de readsorbţia unei cantităţi de IgG pe debriurile celulare ; este cunoscut faptul că celulele moarte sau lezate sînt capabile să fixeze prin adsorbţie o mai mare cantitate de proteine decît cele intacte [13]. Faptul că în timpul incubării şi al spălărilor viabilitatea celulelor se menţine neschimbată exclude posibilitatea ca procentul de IgG* adsorbită ireversibil să crească în timpul experienţelor datorită vătămării celulelor.

Numărul de molecule IgG* fixate de un leucocit PMN este de 100 de ori mai mare decît numărul de molecule de ^{131}I—albumină umană

fixate de o celulă tumorală din *ascita Ehrlich* ($\sim 2 \cdot 10^5$ molecule per celulă) [11]. Deosebirea mare s-ar putea explica prin proteina diferită folosită, dar mai ales prin tipul de celule folosit; este știut că celulele tumorale din ascita Ehrlich au o rată de încorporare *in vitro* destul de mică [11] comparativ cu cea a leucocitelor PMN [9]. În plus, la exprimarea rezultatelor, valorile noastre nu sînt corectate prin scăderea adsorbției, iar valorile obținute de H. Ryser și colab. [11] nu sînt corectate pentru indicele de pinocitoză; de fapt, raportarea cantității legate la numărul total de celule din amestec presupune că toate celulele au fixat proteine, ceea ce nu a fost demonstrat de H. Ryser și colab. [11].

Felul în care numărul de molecule prins de o celulă variază cu concentrația proteică și concentrația celulelor este asemănător cu comportarea semnalată de P.J. Grob și colab. [14] la interacțiunea ^{131}I—IgG de om cu eritrocite umane. Ca și în acest din urmă caz, se constată că numărul de molecule per celulă scade pe măsură ce concentrația celulelor crește (fig. 4), deși în cazul nostru această scădere nu este acompaniată de o scădere a procentului de IgG* încorporată (fig. 5), așa cum se observă la hematii. Această comportare s-ar putea explica, în ambele cazuri, printr-o micșorare a suprafeței eficiente a celulelor, ca urmare a creșterii concentrației lor, ceea ce „ecranează" o parte din receptorii de pe suprafața celulelor și astfel legarea IgG per celulă scade. Desigur, în cazul eritrocitelor, legarea IgG* se face numai prin adsorbție, în timp ce în cazul nostru fenomenul adsorbției este succedat de cel al încorporării. Acest fapt sugerează că încorporarea IgG* este precedată de o adsorbție a moleculelor pe suprafața celulelor. Cum H. Ryser și colab. [11] au arătat că o adsorbție crescută poate fi corelată cu o încorporare crescută, nu pare surprinzător că fixarea ^{131}I—IgG pe suprafața eritrocitelor, fiind un proces de adsorbție, decurge asemănător cu încorporarea IgG* pe leucocitele PMN, deoarece acest ultim proces implică o adsorbție preliminară a proteinei. Perturbarea polarizării membranei, în urma legării unei macromolecule cu sarcini electrice dispuse pe întreaga ei suprafață, poate fi „semnalul" care declanșează încorporarea materialului în profunzimea celulei. După H. Ryser și colab [11], adsorbția ar putea influența încorporarea prin pinocitoză într-un mod specific, și anume prin promovarea mișcărilor membranei.

Creșterea numărului de molecule fixate de o celulă o dată cu creșterea concentrației proteice — în limitele studiate de noi — poate fi determinată fie de mărirea cantității de proteine adsorbite ireversibil, fie de mărirea cantității penetrante în celule, fie de ambii factori. Experiențele noastre nu au adus precizări în această direcție, dar pare rezonabil să se presupună că la acest proces concură mai ales cel de-al doilea factor, deoarece H. Ryser și colab. [11] au arătat că valoarea adsorbției ireversibile nu depinde de concentrația proteinei.

În extractele celulare nu s-a găsit decît o cantitate nesemnificativă de radioactivitate liberă, ceea ce poate sugera că în timpul prelucrării celulelor IgG* nu s-a hidrolizat în cantitate semnificativă pînă la stadiul unor peptide solubile în acid tricloracetic. De altfel, noi am prevenit o hidroliză ulterioară incubării și spălărilor, adăugînd mediilor de extracție o concentrație de iodacetamidă care inhiba catepsinele intracelulare, fără a perturba însă extracția [15]. Lipsei radioactivității libere i se poate

da însă și o altă interpretare, bazată pe o observație a lui B.A. Ehrenreich și Z.A. Cohn [16], care au arătat că ^{131}I-albumina serică pinocitată de macrofage *in vitro* este digerată și produșii săi de digestie sînt excretați în mediu. Este deci posibil ca în experiențele noastre o parte din produșii de digestie radioactivi, solubili în acid tricloracetic, să se piardă din celule fie în timpul incubării, fie în cursul spălărilor, dacă membrana celulară este permeabilă pentru ei.

IgG* se concentrează cu predilecție la nivelul fracțiunii subcelulare „granulare" (8 200 × g), care poate fi considerată ca un fel de lizozomi primari ai leucocitelor PMN [17]. La acest nivel, molecula a fost găsită scindată, neputîndu-se pune în evidență decît fragmentul Fab. Deși absența fragmentelor Fc și F'c nu poate fi considerată demonstrată, datele noastre sînt pertinente cu concluzia lui J.W. Prahl [18] că la pH sub 5,0 papaina poate provoca o scindare mai avansată a fragmentelor Fc și F'c în timp ce fragmentul Fab rămîne nealterat. De altfel, o fracțiune subcelulară bogată în lizozomi, extrasă din splina de iepure și șobolan, este capabilă să scindeze complet *in vitro* fragmentul Fc în prezența cisteinei ca activator [1]. Faptul că fracțiunea „granulară" poate să realizeze *in vitro* exact același efect poate fi considerat ca un argument pentru părerea că în celule, la acest nivel, hidroliza IgG* poate menaja numai fragmentul Fab.

Pentru prezența radioactivității în celelalte fracțiuni subcelulare se pot da cel puțin două explicații alternative. Astfel, radioactivitatea fracțiunii „nucleare" de 920 × g poate fi cauzată fie de urmele de „granule" pe care le conține fracțiunea „nucleară" [9], fie de participarea acestei fracțiuni la hidroliza IgG* (lizozomi secundari?). Radioactivitatea din fracțiunile de 21 500 × g poate să se datoreze prezenței aici fie a unor „granule" cu dimensiuni mai mici [9], fie a unei părți din veziculele micropinocitare care conțin IgG* încorporată. În sfîrșit, în fracțiunea „supernatant" prezența radioactivității ar putea fi o consecință a pierderii din corpusculii subcelulari a radioactivității în cursul centrifugării, dar nu este exclus ca în „supernatant" să fie veziculele micropinocitare cu IgG*; în celulele hepatice, particule osmotic active, care pot fi vezicule micropinocitare, se depun numai la o forță centrifugală între 27000 × g și 39000 × g [19].

Efectul hidrolitic diferit al fracțiunilor cercetate ar putea fi corelat cu distribuția intracelulară a catepsinelor în leucocitele PMN din lichidul peritoneal de iepure [9], [10]. Astfel, din activitatea cateptică totală, 29% este repartizată în fracțiunea „nucleară", 48% în fracțiunea „granulară" și 23% în „supernatant" [9]. Dintre acestea, fracțiunea „nucleară" este cea mai bogată în catepsină E, în timp ce fracțiunile, „granulară" și „supernatant" posedă cantități comparabile din cele două catepsine E și D [10]. La pH 3,5, la care s-a făcut incubarea *in vitro* și care poate fi apropiat de pH-ul intracelular [20], fracțiunea „granulară" se lizează ușor [9] și eliberează cele două enzime, dintre care catepsina D se găsește la pH-ul optim de activitate. Hidroliza IgG* localizate la aceste nivele ar putea avea loc în etape, prin intrarea succesivă în acțiune a celor două catepsine.

Rezultatele noastre arată că în leucocitele PMN există catepsine capabile să scindeze IgG după un mecanism similar cu cel realizat *in vitro*. IgG poate fi hidrolizată, la nivelul granulelor, în fragmente de tip Fab și, poate, Fc și F'c. Acest lucru arată că structura „tripartită" [21] a imunoglobulinelor are o realitate biologică, fragmentele de hidroliză rezultînd în organism ca urmare a unui proces normal de catabolizare a IgG autologe. Acest punct de vedere este în acord cu datele lui T.G. Lawrence și R.C. Williams [22], care au constatat că în serul indivizilor, care conține anticorpi aglutinanți față de determinanți antigenici ai γ-globulinei, relevați prin hidroliză cu pepsină, se găsesc componente cu greutate moleculară mică (3S—5S), capabile să inhibe reacția de aglutinare și care sînt înrudite cu fragmentul peptic 5S al γ-globulinei.

Constatările noastre, ca și datele experimentale ale autorilor citați mai sus [22], sugerează că o acțiune hidrolitică similară s-ar putea exercita și asupra IgG autologe. În acest caz însă, trebuie elucidate cauzele care determină încorporarea IgG autologe.

Dacă se presupune că o moleculă proteică, odată pinocitată, este automat degradată de sistemul lizozominal celular [23], trebuie admis că IgG autologă nu poate pătrunde în celule, din cauză că este fixată și oprită de receptori specifici așezați pe suprafața acestora. Cataboliza-rea proteinelor proprii ar avea deci loc numai în momentul în care o parte din populația autologă devine „străină" pentru organism, poate în urma uzurii metabolice care provoacă un fenomen de îmbătrînire macromoleculară [24], [25].

În aceste condiții, recunoașterea imunologică ar putea avea loc în două etape, cu grade diferite de specificitate [26]. Prima etapă a recunoașterii ar presupune existența moleculei intacte, și în ea moleculele se discriminează, *grosso modo*, pe criteriul „propriu" sau „străin", în funcție de grupările chimice așezate pe suprafața lor. Recunoașterea poate fi efectuată de receptori așezați pe suprafața celulei [23] și determină pinocitarea sau nepinocitarea moleculei. Încorporarea moleculei în interiorul celulei înseamnă că ea a fost recunoscută ca „străină", indiferent dacă este cazul unei proteine eterologe sau autologe alterate prin uzură metabolică. Semnalul de încorporare poate fi dat de perturbarea distribuției sarcinilor electrice pe suprafața membranei celulare.

A doua etapă a recunoașterii imunologice se efectuează după pinocitarea și hidroliza proteinei [1], [24]. Hidroliza proteinei apare ca o condiție necesară pentru a doua etapă a recunoașterii, deci și pentru sinteza de anticorpi. Incapacitatea unei celule de a hidroliza o proteină oarecare nu permite ca această proteină să-și manifeste antigenitatea potențială și, de aceea, ea nu poate fi recunoscută ca străină în a doua etapă a recunoașterii imunologice și nu dă naștere la anticorpi. Un argument care susține acest punct de vedere este acela că animale foarte tinere, care nu pot forma anticorpi, posedă celule capabile să facă pinocitoza, dar ele sînt dotate cu un echipament cateptic mai sărac decît celulele provenite de la animale mature [27]. În acest caz, defecțiunea este la nivelul hidrolizei, aceste animale nefiind capabile să hidrolizeze și să recunoască apoi, ca străin, antigenul pinocitat.

CONCLUZII

Leucocitele PMN izolate din lichidul peritoneal al cobailor sînt capabile să încorporeze cantităţi variabile de IgG* de iepure, care depind de concentraţia proteică şi în celule a amestecului incubat.

IgG* încorporată se repartizează, cu predilecţie, la nivelul „granulelor" leucocitelor, unde se scindează pînă la stadiul de fragment Fab. Fragmentele Fc şi F'c n-au putut fi puse în evidenţă la acest nivel.

Catepsinele din fracţiunea „granulară" sînt capabile să scindeze IgG* pînă la fragmente Fab (fragmentele Fc suferind o hidroliză mai avansată), iar celelalte formaţiuni subcelulare produc o hidroliză care furnizează fragmentele Fab şi Fc.

Prezentată la redacţie
la 18 decembrie 1968

Laboratorul de imunochimie,
Institutul de biochimie al
Academiei Republicii Socialiste România
şi
Laboratorul de genetică moleculară,
Institutul de medicină legală,
Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. C. Motaş, V. Gheţie, St. cerc. biochim., **12**, 69 (1969).
2.. V. Gheţie, C. Medeşan, Rev. roum. Biochim., **6**, (1969).
3. J. L. Fahey, A. P. Horbett, J. biol. Chem., **234**, 2645 (1959).
4. A. Johnson, E. D. Day, D. Pressman, J. Immunol., **84**, 253 (1960).
5. C .C. Curtain, Nature, **182**, 1305 (1958).
6. R. R. Porter, Biochem. J., **73**, 119 (1959).
7. V. Gheţie, C. Motaş, S. Mihăescu, Rev. roum. Biochim., **6**, 29 (1969).
8. C. Bona, A. Sulica, M. Dumitrescu, D. Vranialici, Nature, **213**, 824 (1967).
9. Z. A. Cohn, J. G. Hirsch, J. exp. Med., **112**, 983 (1960).
10. J. Stefanovic, T. Webb, C. Lapresle, Ann. Inst. Pasteur, **103**, 276 (1962).
11. H. Ryser, J. C. Aub, J. B. Caulfield, J. Cell Biol., **15**, 437 (1962).
12. W. E. Parish, Nature, **208**, 594 (1965).
13. H. Holtzer, S. Holtzer, Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, **31**, 373 (1959).
14. P. J. Grob, D. Frommel, H. C. Isliker, S. P. Masouredis, Immunology, **13**, 489 (1967).
15. J. L. Mego, J. D. Mcqueen, Biochim. biophys. Acta, **100**, 136 (1965).
16. B. A. Ehrenreich, Z. A. Cohn, J. exp. Med., **126**, 941 (1967).
17. J. G. Hirsch, Z. A. Cohn, Fed. Proc., **23**, 1023 (1964).
18. J. W. Prahl, Biochem. J., **104**, 647 (1967).
19. J. L. Mego, J. D. Mcqueen, Biochim. biophys. Acta, **111**, 166 (1965).
20. P. Rous, J. exp. Med., **41**, 399 (1925).
21. R. R. Porter, Brit. med. Bull., **19**, 197 (1963).
22. T. G. Lawrence, R. C. Williams, J. exp. Med., **125**, 233 (1967).
23. F. W. Brambel, N. A. Hemmings, J. G. Morris, Nature, **203**, 1352 (1964).
24. H. Walter, Nature, **208**, 76 (1965).
25. V. Gheţie, C. Medeşan, N. St. Chişiu, Rev. roum. Biochim., **4**, 119 (1967).
26. I. Morăru, A. Sulica, în *Actualităţi în microbiologie şi imunologie*, Edit. medicală, Bucureşti, 1969 (sub tipar).
27. J. Stefanovic, D. Kotulova, Folia microbiol., **12**, 372 (1967).

UPTAKE AND BREAKDOWN OF RABBIT IMMUNOGLOBULIN G BY GUINEA PIG POLYMORPHONUCLEAR LEUCOCYTES

SUMMARY

The PMN leucocytes isolated from the peritoneal fluid of guinea pigs were incubated with rabbit IgG double labelled with ^{131}I and fluorescein isothiocyanate. It was found that the amount of IgG fixed by a cell is of 10^7 molecules/cell; it varies in a direct proportion with the protein concentration and in an inverse ratio with the cell concentration.

The IgG fixed was distributed in all the subcellular fractions examined (920 × g, 8,200 × g, 21,500 × g and "supernatant") the highest percentage being associated with the 8,200 × g fraction containing the leucocytes "granules". At this level the IgG was hydrolysed down to the stage of Fab fragments; neither Fc fragments nor trichloroacetic acid soluble radioactive peptides were evidenced here.

The same action was found after "in vitro" IgG incubation with the "granular" fraction. Only Fab fragments were evidenced although in other subcellular fractions also Fc fragments are produced.

ST. CERC. BIOCHIM., 12,3, 265 – 269 (1969)

DIFERENȚIERI ALE SPECTRULUI IZOPEROXIDAZIC ÎN FUNCȚIE DE PARTICULARITĂȚILE STRUCTURALE ALE DONORILOR

ZOIȚA MARCU, I. BRAD, ȘT. NICULESCU, ELENA MOLDOVEANU

Rezumat. — Sînt prezentate cercetările referitoare la spectrul izoperoxidazic al rădăcinii de hrean și frunzei și rădăcinii de plantule de grîu de 7 zile, folosind ca donori benzidina, fenilindiamina, hidrochinona, rezorcina, pirocatechina, guaiacolul și pirogalolul.
Dintre donorii folosiți, benzidina dă posibilitatea să se pună în evidență cel mai mare număr de fracțiuni. Spectrul izoperoxidazelor variază nu numai în funcție de plantă și organ, ci și de natura donorului folosit.

Determinarea activității peroxidazei (1, 11.1.7 — donor : H_2O_2 oxidoreductaza) constituie una dintre preocupările a numeroși cercetători din domeniul biochimiei vegetale.

Avînd un rol deosebit în metabolismul substanțelor ciclice și în același timp în procesele de apărare a plantelor, activitatea peroxidazei a fost analizată sub multiple aspecte. Cu toate acestea, informațiile ce se pot obține din studiul activității acestei enzime sînt încă departe de a fi epuizate. Îndeosebi cercetările referitoare la izoenzimele peroxidazice au atras atenția asupra unor aspecte cu totul inedite.

Unele indicații din literatură scot în evidență diferențieri între fracțiunile peroxidazice în raport cu donorul folosit. Astfel, Jaoska [2], folosind diferite substraturi, constată în plantule de grîu 6—8 fracțiuni izoperoxidazice, care se deosebesc ca activitate. Kay și colab. [3], analizînd rădăcini de hrean și folosind ortodianisidina, au constatat existența a 7 izoperoxidaze. Lanzani și colab. [4] au folosit ca substraturi acizii ferulic, paracumaric, cofeic și sinapic. Determinînd spectrele de absorbție în ultraviolet și vizibil, au constatat deosebiri între compușii obținuți cu ajutorul a două izoenzime peroxidazice, fapt care dovedește că mecanismul lor de acțiune nu este asemănător.

Nye [5] analizînd polifenoloxidazele la cartof, constată că o fracțiune cu migrare rapidă catodică oxidează L-dihidroxifenil-alanina, catecholul, acidul clorogenic și pirogalolul. Din totalul de fracțiuni, patru pot oxida dihidroxifenilalanina, dar numai două pot oxida acizii clorogenic și cofeic.

Siegel și Galston [6], analizînd două soiuri de mazăre, constată că benzile izoperoxidazice catodice oxidează guaiacolul, în timp ce unele benzi anodice reacționează mai bine cu 2,6-dimetoxifenolul.

În prezenta lucrare s-au urmărit două scopuri : unul de ordin metodic, anume de a găsi reactivul cel mai indicat pentru punerea în evi-

denţă a unui număr cît mai mare de fracţiuni izoperoxidazice, şi unul principial, anume de a stabili particularităţile calitative ale diverselor fracţiuni izoperoxidazice, ceea ce ar deschide noi posibilităţităţi de interpretare a diferenţierilor ce s-ar surprinde între organe, soiuri sau specii.

MATERIAL ŞI METODE

Ca material biologic s-au folosit plantule de grîu (soiul Bezostaia 1), la şapte zile de la încolţire, şi rădăcină de hrean.

Din plantulele de grîu s-au separat frunzele şi rădăcinile. Extracţia şi prelucrarea s-au făcut conform unei tehnici descrise anterior [1].

Ca reactivi de culoare, donori de hidrogen, pentru peroxidază s-au folosit: benzidina, fenilendiamina, hidrochinona, rezorcina, pirocatehina, guaiacolul şi pirogalolul.

Concentraţia molară folosită a fost aceeaşi în toate cazurile: 5.10^{-3} M, care s-a dovedit optimă pentru reactivii utilizaţi. O concentraţie mai mare nu permite diferenţierea fracţiunilor apropiate. Modul de lucru este descris în lucrarea amintită.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Rezultatele obţinute de noi sînt prezentate în figurile 1 şi 2. Au fost notate cu + toate fracţiunile care au migrat spre anod, respectiv cu — cele care au migrat spre catod în raport cu startul. Deoarece spectrul obţinut cu ajutorul benzidinei este cel mai complex, el a fost luat ca spectru de referinţă. Fracţiunile de lîngă start au fost notate cu +1 şi —1.

Din analiza figurii 1 reiese că benzidina pune în evidenţă cinci fracţiuni atît la frunză, cît şi la rădăcina plantulei de grîu. La frunză s-au găsit trei fracţiuni +, iar la rădăcini două fracţiuni +.

Folosindu-se ca reactiv fenilendiamina, se evidenţiază fracţiunile —5, —4 şi +1 la frunză şi —3 la rădăcină.

Cu ajutorul hidrochinonei se pune în evidenţă fracţiunea —5 la frunză, iar la rădăcină nici o fracţiune.

Rezorcina evidenţiază fracţiunile —5 şi —4 la frunză şi —3 şi —2 la rădăcină.

Pirocatechina evidenţiază fracţiunile —1 şi +1 la frunză şi —4 şi —3 la rădăcină.

Cu guaiacolul s-au pus în evidenţă la frunză fracţiunile —5, —4, —2 şi +1, iar la rădăcină fracţiunile —4 şi —1.

La rădăcina de hrean s-au pus în evidenţă cu benzidina patru fracţiuni — şi trei fracţiuni +. Cu fenilendiamina şi hidrochinona nu s-a pus în evidenţă nici o fracţiune.

Cu ajutorul rezorcinei s-a pus în evidenţă o singură fracţiune —2, cu pirocatechina două fracţiuni, —4 şi —1, cu guaiacolul şi pirogalolul fracţiunile —4, —3 şi —1.

Făcînd un amestec din guaiacol, hidrochinonă, fenilendiamină şi pirogalol, s-a obţinut un spectru identic cu cel al guaiacolului şi pirogalolului.

Lucrînd cu un amestec din fenilendiamină și hidrochinonă, care luate separat n-au pus în evidență nici o fracțiune, s-a constatat apariția a două benzi, —4 și —1.

Din rezultatele obținute nu se poate desprinde vreo corelație între aspectul spectrului de benzi și structura substanțelor folosite ca substrat,

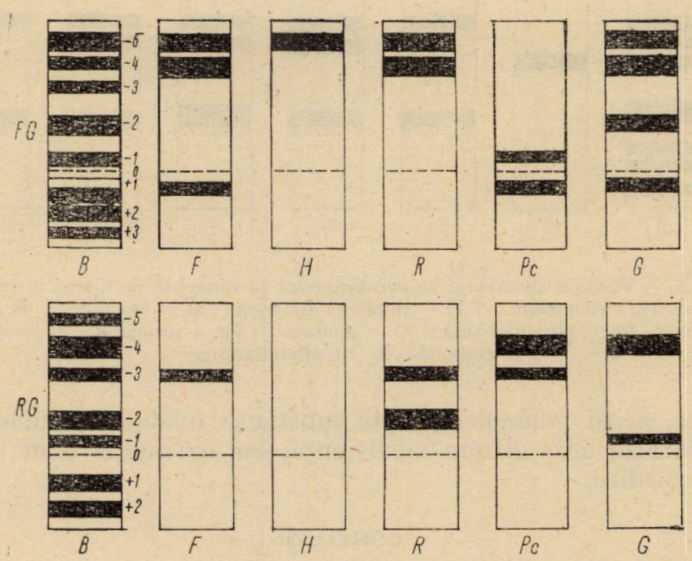


Fig. 1. — Variația spectrului izoperoxidazelor la frunză și rădăcină de plantulă de grîu în funcție de structura donorului: FG—frunză de grîu; RG — rădăcină de grîu; B — benzidină; F — fenilendiamină; H — hidrochinonă; R — rezorcină; Pc — pirocatechină; G — guaiacol.

îndeosebi poziția în moleculă a grupărilor hidroxilice ale acestora. Rămîne totuși ca o constatare că structura moleculei condiționează numărul de benzi. Fără îndoială că potențialul redox are un rol în această privință, dar din lipsa datelor referitoare la potențialul redox al substanțelor folosite nu putem face nici o corelație.

Se observă totuși că benzidina, care are volumul molecular cel mai mare și probabil distanța cea mai mare între cele două grupări aminice, permite evidențierea unui număr maxim de benzi. Este de remarcat faptul că, în marea lor majoritate, fracțiunile + nu pot fi puse în evidență cu alți reactivi decît cu benzidina.

Din ansamblul rezultatelor prezentate mai sus reiese că, atît în cazul determinării activității peroxidazei globale, cît și în acela al determinării spectrului izoperoxidazelor, este neapărat necesar să se specifice denumirea donorului folosit. Ar fi mai corect, credem să se arate că s-a determinat activitatea benzidin-oxidazică, și nu activitatea peroxidazică cu ajutorul benzidinei. În ceea ce privește nomenclatura izoenzimelor peroxidazice, dacă evidențierea acestora s-a făcut, de exemplu, cu ajutorul

benzidinei, ar fi mai bine să se spună că s-au determinat fracţiunile benzidin-peroxidazice.

Se poate afirma că o înţelegere mai bună a diferenţelor de metabolism şi biologice se poate realiza dacă se folosesc şi substanţe specifice pentru anumite fracţiuni. Utilizarea unor donori, ca acidul indolilacetic,

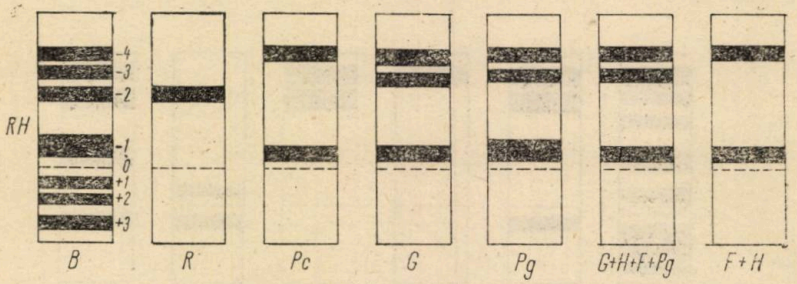


Fig. 2. — Variaţia spectrului izoperoxidazelor la rădăcină de hrean în funcţie de structura donorului: RH — rădăcină de hrean; B — benzidină; R — rezorcină; Pc — pirocatechină; G — guaiacol; Pg — pirogalol; H — hidrochinonă; F — fenilendiamină.

fenoxiacetic, acizii giberelici şi alte substanţe oxidabile fiziologic active, ar putea furniza date asupra inexistenţei sau existenţei unor benzi peroxidazice specifice.

CONCLUZII

Numărul de fracţiuni peroxidazice ce se evidenţiază este în funcţie de natura donorului folosit, deoarece nu orice donor le poate pune în evidenţă.

Dintre diferiţii donori încercaţi, benzidina permite să se pună în evidenţă numărul maxim de fracţiuni.

La aceeaşi plantă, spectrul izoperoxidazelor poate varia de la organ la organ, atît prin numărul fracţiunilor, cît şi prin intensitatea activităţii acestora, şi în funcţie de natura donorului folosit.

Primită la redacţie
la 12 septembrie 1968

Secţia de fiziologie şi biochimie vegetală agricolă,
I.C.C. P.T.
Bucureşti-Fundulea

BIBLIOGRAFIE

1. Brad I., Hurduc N., Niculescu N., St. Marcu Zoiţa, St. cerc. biochim., **11**, 117 (1968).
2. Jaoska V., Jaoska V., Izv. Akad. Nauk Eston SSSR, ser. Biol., **17**, 168 (1968).
3. Kay E., Shannon M. L. Lew J. Y., J. biol. Chem., **242**, 2470 (1967).
4. Lanzani G. A., Sequi P. Manzocchi L. D., Agrochimica, **45**, 403 (1967).
5. Nye T. G., Kern C. H., Aldrich R. F., Phytochemistry, **7**, 741 (1968).
6. Siegel B. Z., Galston A. W., Plant Physiol. **42**, 221 (1967).

DIFFERENTIATIONS IN ISOPEROXIDASE PATTERNS AS A FUNCTION OF THE STRUCTURAL PECULIARITIES OF THE DONORS

SUMMARY

The pattern of isoperoxidases in the root of horse radish as well as in the leaves and roots of 7-day old wheat seedlings, is described ; benzidine, phenylenediamine, hydroquinone, resorcin, pyrocatechol, guaiacol and pyrogallol were used as donors.

Comparative studies revealed the greatest number of enzymatic fractions in samples where benzidine was used as a donor. The isoperoxidase pattern varies as a function of the plant species and of the plant part subjected to analysis and also as a function of the donor applied.

ST. CERC. BIOCHIM., 12, 3, 271–274(1969)

SORBȚIA ALBASTRULUI DE TOLUIDINĂ DE CĂTRE ȚESUTUL FOLIAR DE TOMATE ȘI DE ARDEI LA TEMPERATURI RIDICATE

ANGELA MIHĂESCU

Rezumat. — Cercetarea sorbției albastrului de toluidină de către țesutul foliar de tomate și de ardei a arătat că ea depinde nu numai de starea de denaturare termică a proteinelor protoplasmatice, ci și de alți factori.

Influența temperaturilor ridicate asupra însușirilor de sorbție ale țesuturilor animale pentru coloranți a fost puțin cercetată. Printre lucrările din acest domeniu poate fi menționată aceea a lui V. P. Butkevici [1], după care sorbția coloranților de către mușchiul gastrocnemian de broască pentru coloranți crește cu temperatura. Se pare că acest rezultat s-ar datora denaturării termice a proteinelor tisulare, întrucît, după V. Ia. Alexandrov și D. N. Nasonov [2], A. D. Braun [3], [4] F. Haurowitz și colab. [5], denaturarea termică mărește capacitatea de sorbție a proteinelor pentru coloranți. Cum însă pe mușchi s-a lucrat între 15 și 40°C, iar pe proteine între 45 și 100°C, concluzia de mai sus nu poate fi considerată ca sigură.

Pe țesuturile vegetale încă nu s-a lucrat, deși cercetările de acest gen ar putea permite eventual elaborarea unor teste pentru caracterizarea rezistenței plantelor la temperaturi ridicate. În consecință am făcut unele investigații, urmărind să stabilim pe țesutul foliar al unor plante legumicole :

— variația capacității de sorbție a acestui țesut pentru coloranți cînd țesutul este încălzit împreună cu soluția de colorant (varianta experimentală A);

— variația aceleiași însușiri cînd țesutul este întîi încălzit la temperaturi ridicate, apoi răcit la temperatura ambiantă și abia atunci introdus în soluția de colorant (varianta experimentală B).

MATERIAL ȘI METODĂ

Am lucrat pe frunze de tomate (*Solanum lycopersicum*) soiurile Apollo și Eurocrom și pe frunze de ardei (*Capsicum annuum*) soiul Kalinkov, colectate de pe plante crescute în seră. S-a folosit albastru de toluidină, unul din coloranții cu care V. Ia. Alexandrov și D.N. Nasonov [2] au cercetat sorbția serului sanguin și a diferitelor substanțe proteice.

Sorbția țesutului foliar am cercetat-o cu ajutorul metodei elaborate de A. D. Braun și M. F. Ivanov [6] pentru țesuturi animale, dar adaptînd-o la condițiile cercetărilor noastre. Această metodă constă în cufundarea

țesutului pentru o anumită perioadă de timp în soluția apoasă a unui colorant, spălarea repetată a țesutului cu apă salinizată, extragerea colorantului pătruns în țesut cu alcool apos acidulat și colorimetrarea față de o soluție etalon a colorantului dizolvat în același solvent.

Prin încercări prealabile am ajuns la precizarea următoarelor condiții de lucru : probe de țesut 0,50 g ; soluția albastrului de toluidină 0,10% ; durata contactului între țesut și soluția de colorant — 30 min ; cantitatea soluției de colorant în care se introduce țesutul — 5,0 ml ; cantitatea de alcool acidulat (75 ml alcool etilic 96°, 23 ml apă distilată și 2 ml acid acetic glacial sau acid clorhidric conc. d = 1,19), pentru extragerea colorantului din țesut 10,0 ml, durata extracției 24 de ore, la temperatura laboratorului. Menționăm că durata de contact între țesutul foliar și soluția de colorant stabilită de noi corespunde celei preconizate de alți cercetători pentru alte țesuturi, de exemplu 10—30 min pentru țesuturile de origine animală [7], 5—10 min pentru suspensiile de drojdii [8] etc.

REZULTATELE OBȚINUTE ȘI SEMNIFICAȚIA LOR

Unele rezultate obținute în cadrul variantei experimentale A sînt prezentate în tabela 1.

Tabela 1

Albastrul de toluidină (mg) extras din probe de cîte 0,50 g frunze de tomate și ardei, menținute în soluție apoasă de colorant 0,1% timp de 30 min la temperatura laboratorului (probele martor) sau la temperaturi ridicate

Frunzele martor		Frunze preîncălzite		Modificarea sorbției %
t°C	colorant mg	t°C	colorant mg	
Frunze de tomate				
20	1,04	40	1,34	+29
21	1,24	40	1,52	+23
20	1,06	60	1,68	+57
20	1,10	60	1,62	+47
22	1,00	80	1,66	+66
22	1,16	80	1,70	+47
21	1,04	100	1,80	+73
22	1,10	100	1,88	+71
Frunze de ardei				
20	1,20	40	1,60	+33
22	1,00	60	1,50	+50
21	0,98	80	1,64	+68
21	1,03	100	1,72	+67

Se constată că la temperatura laboratorului (20—22°C), atît la tomate, cît și la ardei, 0,50 g țesut foliar sorb aproximativ 1,0 mg albastru de toluidină, ceea ce înseamnă că în acest țesut se realizează o concentrație globală de colorant de aproximativ 0,2 g %, adică de circa două ori mai mare decît în soluția înconjurătoare (0,1 g %). La temperaturi ridicate, sorbția crește cu pînă la 70% la 100°C și chiar mai mult atît la țesutul foliar

de tomate, cît și la cel de ardei. S-ar părea deci că fenomenul se produce conform prevederilor, dacă admitem că accentuarea sorbției se datorește denaturării termice a proteinelor protoplasmatice, care și ea se accentuează la temperaturi din ce în ce mai ridicate.

Unele rezultate obținute în cadrul variantei experimentale B sînt prezentate în tabela 2.

Tabela 2

Albastru de toluidină (mg) extras din probe de cîte 0,50 g frunze de tomate și ardei, menținute timp de 30 min la temperatura laboratorului (frunzele martor), respectiv la temperaturi ridicate și introduse după răcire la temperatura laboratorului, în soluția apoasă de colorant 0,1%, pentru 30 min

Frunzele martor		Frunze preîncălzite		Modificarea sorbției %
t°C	colorant mg	t°C	colorant mg	
Frunze de tomate				
21	1,12	40	1,32	+18
21	0,94	40	1,24	+32
20	0,94	60	1,00	+ 6
21	1,02	60	0,92	−10
22	0,88	80	0,74	−16
21	0,82	80	0,74	−10
20	1,20	100	0,92	−23
20	1,06	100	0,82	−23
Frunze de ardei				
22	1,00	40	0,90	−10
20	1,10	60	0,99	−10
21	1,14	80	1,02	−11
21	1,06	100	0,98	− 8

Examinarea acestor rezultate duce însă la altă concluzie decît în cazul rezultatelor consemnate în tabela 1. Într-adevăr, dacă admitem că la temperaturi ridicate accentuarea sorbției coloranților de către proteinele protoplasmatice se datorește denaturării lor prin căldură, era de așteptat ca în cadrul variantei experimentale B să obținem rezultate asemănătoare cu cele din cadrul variantei experimentale A. Or, din compararea datelor cuprinse în tabelele 1 și 2 se constată că la țesutul foliar de tomate și de ardei preîncălzit la temperaturi ridicate sorbția nu crește, ci rămîne apropiată de aceea a țesutului martor. Diferențele în minus sînt relativ mici, încît par să intre în limitele abaterilor experimentale, mai ales dacă se examinează valorile paralele obținute în determinările făcute la aceeași temperatură atît în tabela 1, cît și în tabela 2.

CONCLUZII

La temperaturi ridicate, sorbția albastrului de toluidină de către țesutul foliar de tomate și ardei prezintă deosebiri dacă denaturarea termică a proteinelor tisulare se face în prezența sau în absența colorantului : în primul caz ea crește, iar în al doilea rămîne practic egală cu aceea a

ţesutului martor. Aceasta înseamnă că la ţesutul foliar sorbţia depinde nu numai de starea proteinelor protoplasmatice, ci şi de alţi factori, neluaţi pînă acum în considerare.

Prezentată la redacţie
în 27 ianuarie 1969

Catedra de biochimie
a
Universităţii Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. V. P. Butkevici, Vestnik Leningrad Univ., **1**, 124 (1948).
2. V. Ia. Alexandrov, D. N. Nasonov, Arhiv. Anat. Histol. i Embriol., **22**, 11 (1939).
3. A. D. Braun; Biohimia, **13**, 409 (1948).
4. A. D. Braun, Dokl. AN SSSR, **62**, 263 (1948).
5. F. Haurowitz, F. Di-Moia, S. Tekman, J. amer. chem. Soc., **74**, 2265 (1952).
6. A.D. Braun, M. F. Ivanov, Arhiv. Anat. Histol. i Embriol., **12**, 3 (1933).
7. A. S. Trosin, Biul. exsp. biol. i med., **32**, 162 (1951).
8. S. N. Romanov, Biul. exsp. biol. i med., **32**, 224 (1951).

SORPTION OF TOMATO AND PEPPER LEAF TISSUE FOR TOLUIDINE BLUE AT HIGH TEMPERATURES

SUMMARY

Sorption of toluidine blue by tomato and pepper leaf tissue depends not only on the state of thermal denaturation of protoplasm proteins but also on other factors.

HEMOGLOBINE ŞI HEMOGLOBINOPATII

V. BRATU

Hemoglobina este considerată a doua substanţă ca importanţă în natură, prima fiind clorofila. Înlocuirea magneziului din clorofilă cu fierul din hem constituie cheia care a deschis uşa întregii vieţi aerobe [19].

Rolul important pe care-l deţine hemoglobina, ca pigment respirator, se datoreşte proprietăţii sale de a fixa reversibil oxigenul şi a-l ceda cu destulă uşurinţă ţesuturilor.

Hemoglobina sporeşte capacitatea plasmei de a se combina cu oxigenul de la 0,5 mlO_2/100 ml la circa 25 mlO_2/100 ml sînge, permiţînd organismului să transfere în mod rapid şi eficace oxigen oricărui ţesut activ îndepărtat de suprafaţa respiratorie [19].

În afara rolului fundamental jucat în procesul de respiraţie, hemoglobina deţine un rol important în menţinerea echilibrului acidobazic. Sistemul tampon realizat de oxihemoglobină/hemoglobină redusă contribuie, în mod deosebit, la menţinerea pH-ului sanguin în anumite limite [35].

Uşurinţa cu care se poate obţine liza globulelor într-o soluţie hipotonă şi faptul că 95% din conţinutul eritrocitului este format din hemoglobină au făcut ca aceasta să constituie materialul cel mai potrivit pentru studiul proteinelor [2].

Descoperirea făcută de către Pauling în 1949 [26], că hemoglobina persoanelor cu anemii cu celule falciforme se deosebeşte electroforetic de hemoglobina subiecţilor normali, a constituit punctul de plecare în studiul hemoglobinelor anormale. În plus, o dată cu precizarea de către Ingram [17], [18] a deosebirii chimice — un aminoacid într-o catenă de 146 de aminoacizi —, autorul a scos la iveală rolul pe care pot să-l aibă modificările minime ale moleculei asupra fiziologiei eritrocitului şi deci asupra întregului organism. Se deschide, cu această ocazie, o nouă etapă în studiul maladiilor, etapa studierii maladiei la nivel molecular.

Într-o perioadă relativ scurtă au fost descoperite o serie întreagă de hemoglobine anormale, stabilindu-se rolul jucat de fiecare într-un anumit proces patologic.

Dacă pînă la această dată cauzele anemiilor hemolitice erau căutate fie în factori plasmatici, fie în constituenţii minori ai eritrocitelor (anemiile enzimopenice), fie în existenţa unei distrugeri accelerate la nivelul splinei,

de la această dată se conturează o nouă grupă de anemii, cauzate de existența unor anomalii la nivelul molculei de hemoglobină, grupa hemoglobinopatiilor sau hemoglobinozelor [21].

STRUCTURA HEMOGLOBINEI

Hemoglobina este o proteină conjugată, care constă dintr-o parte proteică — globina — și o grupare prostetică — hemul.

Ea are o greutate moleculară de 68 000 și reprezintă aproximativ 95% din proteinele solubile ale eritrocitului [2].

Gruparea prostetică — hemul — ,pigment colorat, este o protoporfirină IX ce conține fier și are o compoziție chimică constantă în diferite hemoglobine. Ea se combină reversibil cu oxigenul, constituind partea fiziologic activă a moleculei. Nu se cunosc variații structurale condiționate genetic [2], [6], [19], [20], [21].

Partea proteică — globina — diferă de la o specie la alta și imprimă specificitatea hemoglobinei respective.

În structura globinei intră aproximativ 600 de resturi de aminoacizi, grupate în patru catene polipeptidice, două cîte două identice între ele. Existența acestor patru catene a fost confirmată prin analiza grupărilor N-terminale [34], [35]. Ele sînt dispuse elicoidal, dînd moleculei de hemoglobină forma elipsoidală [22], [27].

Cît despre modul în care se realizează legătura dintre globină și hem (fierul din hem), cei mai mulți autori admit că aceasta s-ar face prin intermediul grupărilor imidazol din histidină [2], [13], [19], [20], [22].

Este puțin probabil ca cisteina să participe la această legătură, întrucît s-a găsit o mioglobină fără cisteină [19].

S-ar putea ca legătura să afecteze și atomul de fier al inelului porfirinic. Modificarea spectrului de absorbție al unei soluții alcaline de porfirină liberă, la adăugarea globinei reactive, demonstrează afectarea inelului porfirinic [19].

Întrucît grupările hemice pot fi oxidate de molecule relativ mari, cum ar fi fericianura de potasiu, și deoarece pot fi înlăturate și înlocuite în globină, ele nu pot fi situate profund, ceea ce a fost confirmat cu ajutorul cristalografiei cu raze X [19], [22], [27].

HEMOGLOBINE NORMALE

Hemolizatul care se obține prin liza eritrocitelor normale poate fi separat, prin mijloace fizico-chimice, în mai multe componente cu structură diferită. S-a stabilit astfel că, în afara eterogenității cauzate de existența formelor reduse, oxigenate, oxidate sau a carboxihemoglobinei și care pot fi excluse prin anumite procedee, există cîteva fracțiuni hemoglobinice care apar ca entități bine definite și a căror proporție rămîne aproape constantă în condițiile unui organism normal.

Sînt recunoscute astăzi patru hemoglobine normale sau fiziologice: Hb A, Hb F, Hb A_2, Hb U (embrionară). Hb A_3, care se întîlnește în mod normal în orice hemolizat, nu constituie o hemoglobină cu structură diferită,

ci, aşa cum vom vedea ulterior, o hemoglobină provenită din hemoglobina normală în cursul procesului de îmbătrînire a eritrocitului [2], [6], [15], [33].

Hemoglobina A (Hb A = α_2 β_2) reprezintă componenta majoră (95—97%) a hemoglobinei preparate din eritrocitele adulţilor normali. Ea este definită, în mod obişnuit, prin mobilitatea ei electroforetică, punctul ei izoelectric, care se află la pH 6,87, şi prin viteza denaturării în mediu alcalin şi acid [2], [34]. Cele mai multe proprietăţi fizice şi chimice stabilite asupra hemoglobinei umane se referă, de fapt, la hemoglobina A.

Prin determinarea aminoacizilor N-terminali din molecula de hemoglobină A s-a stabilit existenţa a patru radicali de valină, deci patru catene polipeptidice. Comportarea lor diferită la hidroliza acidă a arătat că este vorba de două tipuri diferite de catene : două din aceste catene eliberează rapid grupările N-terminale la hidroliza acidă, şi anume dipeptidul valil-leucină, pe cînd celelalte două eliberează în aceleaşi condiţii de hidroliză acidă doar valina, şi aceasta cu o viteză mult mai mică. Aceste catene au fost denumite catene α, respectiv catene β. Secvenţa N-terminală a acestora din urmă a fost găsită a fi valină-histidină-leucină [2], [19], [34]. În momentul de faţă se cunoaşte complet secvenţa aminoacizilor din cele două tipuri de catene polipeptidice α şi β. Acestea cuprind 141 şi respectiv, 146 de resturi de aminoacizi.

Hemoglobina F (Hb F = α_2 γ_2) predomină cantitativ în sîngele fătului. Hemoglobina adultă apare în eritrocite în a 13-a săptămînă de viaţă fetală şi creşte procentual pînă înlocuieşte aproape complet hemoglobina fetală la sfîrşitul primului an de viaţă postnatală [2], [4], [19], [20], [21]. La nou-născut, Hb F se găseşte în proporţie de 70 — 75%.

Hemoglobina F se găseşte, cu toate acestea, şi în sîngele adulţilor bolnavi de unele anemii ereditare sau dobîndite, cum ar fi : talasemia majoră, anemia drepanocitară, asociere drepanocitoză-talasemie, hemoglobinoză C-talasemie sau anemie pernicioasă, leucemie, anemie Biermer, graviditate etc. [2], [4], [11], [19], [20], [21]. Ea poate să apară, de asemenea în „persistenţa ereditară a hemoglobinei F", o anomalie ereditară întîlnită la unii negri, în care hemoglobina F se găseşte în concentraţie foarte mare, fără ca să existe vreo manifestare clinică de boală [2], [21].

Hb F are o mobilitate electroforetică uşor diferită de a hemoglobinei A. Hb F este caracterizată, în mod obişnuit, şi determinată prin rezistenţa ei la denaturarea alcalină, proprietate care este, de fapt, caracteristica ei cea mai importantă [2], [34].

Întrucît Hb A şi Hb F au în comun o pereche de catene α, rezistenţa crescută la denaturarea alcalină a Hb F a fost atribuită unei anumite proprietăţi a catenelor gamma.

Hb A se disociază la pH 11 în subunităţi simetrice, avînd greutatea moleculară aproximativ jumătate din cea a hemoglobinei întregi. Deasupra pH-ului 11, Hb A se disociază în subunităţi cu greutate moleculară mai mică, probabil în lanţuri singulare. Modificările moleculei de Hb A expuse la pH 11,6 nu sînt reversibile şi în aceste condiţii are loc o denaturare intensă. Disocierea Hb F în jumătăţi de moleculă se produce la valori de pH mai ridicate decît în cazul Hb A ; această disociere este completă la pH 11,6, iar Hb F păstrează timp de cîteva zile în acest pH, caracteristicile spectroscopice ale hemoglobinei nedenaturate.

Întrucît denaturarea Hb A se produce la valori de pH la care molecula pare să fie disociată în catene singulare, se poate presupune că hemoglobina F este mai rezistentă la denaturarea alcalină decît Hb A, întrucît ea se disociază în catene singulare la valori mai mari de pH decît Hb A [2].

Diferența de rezistență la denaturarea alcalină a Hb F ar putea fi datorată unor legături chimice diferite ce se stabilesc între lanțurile peptidice ale acestei hemoglobine. În sprijinul acestei idei vine și faptul că Hb Bart's, deși are în structură numai lanțuri gamma, are o rezistență scăzută la denaturarea alcalină [2].

HEMOGLOBINA A_2 (α_2 β_2)

Această componentă minoră a fost izolată și descrisă pentru prima dată de către Kunkel și Wallenius [24]. Ea reprezintă 2,5 — 3,5% din hemoglobina totală a adulților normali. Hemoglobina A_2 începe să fie sintetizată încă din viața fetală, o dată cu Hb A, și ajunge la o concentrație de 2,5 — 3,5%, care se menține constantă în tot restul vieții.

Hb A_2 este ușor de separat de Hb A, întrucît se caracterizează printr-o mobilitate electroforetică (la pH 8,6) considerabil mai mică decît a Hb A.

Kunkel și Wallerius [24] și apoi mulți alți autori au arătat că nivelul Hb A_2 crește de 2—3 ori peste valorile normale în talasemia minoră [2], [4], [6], [7], [8], [11], [21].

Analiza chimică a arătat că Hb A_2 are o pereche de catene identice celor două catene α din Hb A. Cea de-a doua pereche de catene se deosebește atît de catenele β din Hb A, cît și de catenele γ din Hb F. Aceste catene au fost denumite catene δ.

Dacă se calculează numărul relativ de aminoacizi în poziții corespunzătoare de-a lungul celor patru catene ce intră în structura hemoglobinelor, se observă o corespondență de 42% între lanțurile α și β, o corespondență de 39% între lanțurile α și γ și de 71% între lanțurile β și γ [2].

HEMOGLOBINELE EMBRIONARE

La embrion, în stadii foarte tinere, au fost puse în evidență două hemoglobine, care se deosebesc de Hb F prin rezistența lor la denaturarea alcalină și prin mobilitatea lor electroforetică. Rezistența la denaturare alcalină este intermediară între Hb A și Hb F, iar mobilitatea electroforetică este mai mică decît a Hb F.

Primul tip, numit $Gower_1$, ar fi format din patru catene ε, fiind deci un tetramer ε_4, prezent în hematii chiar de la începutul vieții embrionare, iar cel de-al doilea tip, $Gower_2$, ar fi format din două catene α și două catene ε și apare puțin mai tîrziu decît hemoglobina $Gower_1$.

Aceste două hemoglobine sînt înlocuite, treptat, începînd cu săptămîna a 12-a, de Hb F, căreia i se substituie apoi hemoglobina adultă, în cursul săptămînilor care precedă și al lunilor care urmează nașterii. Există deci din primele zile de viață intrauterină pînă în primele luni după naș-

tere o adevărată embriogeneză biochimică, ale cărei etape se succedă în timp şi corespund dispariţiei unei hemoglobine în favoarea altei hemoglobine [2], [6], [19].

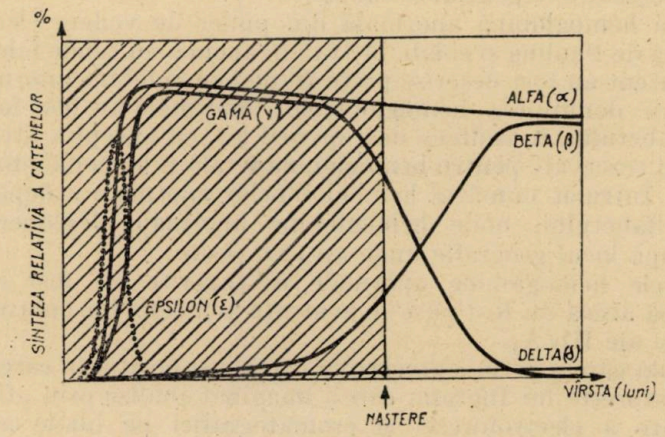


Fig. 1. — Sinteza catenelor polipeptidice ale moleculei de hemoglobină în viaţa intrauterină şi postnatală (după E. Zuckerkandl).

HEMOGLOBINA A_3

În eritrocitele normale, alături de Hb A, Hb F şi HbA_2 se găseşte totdeauna o cantitate variabilă de Hb A_3. Această fracţie creşte procentual în probele vechi de sînge [38].

Hemoglobina A_3 migrează în cîmpul electroforetic la pH 8,6 mai repede decît Hb A, dar nu se separă complet de aceasta. Datele acumulate pînă în prezent arată că Hb A_3 este un component eterogen, care la cromatografie poate fi separat în cel puţin două subfracţiuni [2], [15].

Hb A_3 este, foarte probabil, un derivat al Hb A. Analiza prin „fingerprint" a Hb A_3 a pus în evidenţă un singur peptid, care nu se găseşte în Hb A şi care a fost identificat a fi glutationul [2].

Eterogenitatea Hb A_3 poate fi explicată prin legarea unui număr diferit de molecule de glutation la molecula de hemoglobină [2].

HEMOGLOBINE ANORMALE

Sînt definite ca hemoglobine anormale hemoglobinele care diferă prin proprietăţile lor fizice şi chimice de componenţii normali. Aceste modificări se reflectă, pentru unele din ele, şi asupra proprietăţilor fiziologice. Hemoglobinele anormale pot fi grupate în :

— Hemoglobine anormale datorită substituţiei de aminoacizi în una din cele două catene polipeptidice. Se obţin în asemenea situaţii, după caz, catene α, β, γ sau δ modificate. Fiecare lanţ polipeptidic fiind format dintr-un număr ridicat de aminoacizi, aceste modificări pot fi multiple.

— Hemoglobine anormale datorită împerecherii anormale a unor catene polipeptidice normale (prin substituţie de lanţuri întregi).

Hemoglobinele anormale reprezintă expresia directă a mutaţiilor, care sînt moştenite ca gene autosomale.

Prima hemoglobină anormală din punct de vedere electroforetic a fost descrisă de Pauling şi colab. în 1949 în anemia cu celule falciforme [26]. Pînă în prezent au fost descrise peste 70 de hemoglobine anormale.

Pentru denumirea hemoglobinelor anormale au fost folosite iniţial literele alfabetului, în ordinea descoperirii lor, cu excepţia literelor F şi S, care au fost rezervate pentru hemoglobina fetală şi hemoglobina din anemia falciformă. Întrucît numărul hemoglobinelor anormale a depăşit numărul literelor alfabetului, noile hemoglobine anormale descoperite au fost definite după locul geografic unde au fost găsite.

Primele hemoglobine anormale descoperite au fost variante ale Hb A, după aceea au fost puse în evidenţă hemoglobine anormale variante ale Hb F şi ale Hb A_2.

Metoda care a permis precizarea catenei şi poziţia în care are loc anomalia se datoreşte lui Ingram, care a imaginat analiza prin „finger print", o combinare a electroforezei şi cromatografiei pe hîrtie a digeratului triptic de hemoglobină [17], [18].

S-a precizat că Hb S se deosebeşte de Hb A printr-un singur aminoacid (doi aminoacizi pe moleculă), substituirea acidului glutamic din poziţia a şasea a catenei polipeptidice β prin valină, că în Hb C acelaşi aminoacid este înlocuit cu lizina. Folosirea acestei metode a permis precizarea anomaliei pentru marea majoritate a hemoglobinelor anormale cunoscute astăzi.

Există hemoglobine anormale cu substituţii de aminoacizi pe catena α, β, γ sau δ. În acelaşi timp trebuie precizat că substituţia de aminoacizi poate avea loc la diferite nivele ale lanţului polipeptidic respectiv. Formula chimică pentru exprimarea hemoglobinelor anormale poate fi scrisă indicînd, o dată cu denumirea hemoglobinei, lanţul polipeptidic care este alterat şi aminoacidul substituit. De exemplu: Hb S — α_2^A β_2^6 Glu → val, Hb C = α_2^A β_2^6 Glu →→ lis, Hb I = α_2^{16} lis → glu β_2^A.

Un fapt ce trebuie reţinut este că eterogenitatea hemoglobinelor nu poate fi pusă în evidenţă totdeauna cu ajutorul metodelor fizice de analiză [5].

Nu totdeauna substituirile de aminoacizi determină modificări decelabile prin mijloace fizico-chimice. Modificări diferite în structura primară pot determina aceeaşi modificare a încărcăturii electrice. Cele mai evidente exemple în acest sens le constituie hemoglobinele D, G, M şi O [1], [3], [5]. Fiecare din acest grup prezintă aceeaşi mobilitate electroforetică, însă aminoacidul substituit şi nivelul la care a avut loc această substituţie diferă de la o hemoglobină la alta.

Pentru marea majoritate a hemoglobinelor anormale, substituirile de aminoacizi influenţează puţin structura terţiară a hemoglobinei, întrucît cele mai multe resturi interesate în substituţie proemină în afara configuraţiei tridimensionale a moleculei [2]. Cîteva excepţii de la această regulă sînt reprezentate de aminoacizii care caracterizează substituirile în hemoglobinele M, substituiri ce afectează puntea histidinică dintre globină şi fier. S-a sugerat [13], [20], [22] că regiunile în care au loc substituirile

în cadrul acestor hemoglobine sînt situate în vecinătatea celei de-a şasea poziţii de coordinaţie a atomului de fier şi determină formarea unui complex stabil cu gruparea hemică. Anomalia caracteristică a acestor hemoglobine constă în dificultatea neobişnuită de a reduce forma ferică a atomului de fier din gruparea hem la forma feroasă.

În afara acestor hemoglobine anormale datorite unor substituţii de aminoacizi, există cîteva hemoglobine formate numai dintr-un singur fel de catene polipeptidice, ca Hb H, care este formată din patru lanţuri β, şi Hb Bart's, care constă din patru lanţuri γ. Hemoglobina H ar corespunde formei adulte a hemoglobinei Bart's [6], [11]. Formarea acestor două hemoglobine se datoreşte unei deficienţe în sinteza lanţurilor α şi se întîlneşte în unele forme de talasemie.

Tetramerul δ_4, teoretic posibil, nu a fost încă descris cu certitudine [6].

O altă hemoglobină cu anomalie în modul de împerechere a lanţurilor este hemoglobina Lepore, constituită din două lanţuri α, împerecheate, după unii autori [2], cu un lanţ β şi un lanţ δ, pe cînd, după alţii [6], cea de-a doua pereche de lanţuri ar avea jumătate secvenţa aminoacizilor ca în catenele β, iar cealaltă jumătate ar avea secvenţa lanţului δ.

În sfîrşit, în sinteza hemoglobinei pot interveni tulburări în ceea ce priveşte ritmul de sinteză, care are drept urmare o modificare a raporturilor dintre diferitele fracţiuni hemoglobinice, situaţie caracteristică pentru talasemii.

Ca şi în celelalte hemoglobinopatii, mutaţia poate afecta gena regulatoare α sau gena regulatoare β ,în funcţie de care talasemia se împarte în α-talasemie şi β-talasemie.

CONTROLUL GENETIC AL SINTEZEI HEMOGLOBINELOR

Hemoglobina, fiind o proteină, este supusă aceloraşi mecanisme de sinteză ca oricare altă proteină.

Tipul hemoglobinei, concentraţia ei sînt condiţionate de existenţa şi activitatea genelor structurale şi reglatoare respective. Se admite astăzi că pentru fiecare tip de catenă polipeptidică ce intră în structura hemoglobinelor există o genă structurală corespunzătoare. Organismul uman fiind diploid, rezultă că gena respectivă va fi reprezentată pe ambii cromozomi omologi. Se admite, de asemenea, că genele structurale ce participă la sinteza hemoglobinelor sînt localizate pe două perechi de cromozomi diferiţi :

— o pereche de cromozomi omologi poartă genele structurale α, răspunzătoare de sinteza catenelor polipeptidice α ;

— o a doua pereche de cromozomi poartă genele structurale β, γ şi δ, responsabile de sinteza catenelor respective.

Alături de aceste gene structurale, pe fiecare pereche de cromozomi se găsesc genele reglatoare respective. Astfel, pe prima pereche se va găsi gena reglatoare ce reglează cantitatea de catene polipepdidice α ce se va sintetiza, pe cea de-a doua pereche gena reglatoare ce va regla cantitatea catenelor polipeptidice β, γ şi δ [2], [6], [20], [25], [37].

Întrucît fiecare hemoglobină are în structura ei două tipuri de catene, în sinteza ei vor fi implicate două perechi de gene structurale. De exemplu, sinteza Hb A va fi controlată de o pereche de gene structurale α^A, situate pe o pereche de cromozomi omologi, şi o pereche de gene structurale β^A, situate pe altă pereche de cromozomi omologi. Prin intermediul genelor reglatoare respective, ele vor dirija sinteza Hb A.

Deşi genele structurale sînt prezente pe cromozomi chiar de la formarea garniturii diploide, activitatea lor nu este egală în decursul dezvoltării. Trecerea de la hemoglobina embrionară la hemoglobina fetală şi de la aceasta la hemoglobina adultă este datorată acţiunii genelor reglatoare care coordonează activitatea genelor structurale, în funcţie de nevoile organismului şi de capacitatea fiziologică a hemoglobinei respective [2], [6], [38].

Procesul mutaţional poate afecta genele structurale α sau genele structurale β (respectiv γ şi δ), rezultînd hemoglobine cu structură modificată în catena respectivă (Hb I, Hb C, Hb S etc.). Procesul mutaţional poate afecta, de asemenea, genele reglatoare α sau β, acesta determinînd, la rîndul lui, modificări în concentraţia fracţiunilor hemoglobinice normale. Rezultă că mutaţia genelor structurale va determina apariţia unor hemoglobine anormale, iar mutaţia genelor reglatoare va determina o scădere a hemoglobinei totale şi o schimbare a raporturilor existente, situaţie întîlnită în talasemie.

Menţionăm că mutaţiile pot fi în doze simple sau duble, determinînd genotipul hetero- sau homozigot; în alte situaţii, se poate întîlni un dublu heterozigotism structural sau un dublu heterozigotism structural-reglator.

În cazul mutaţiei unei singure gene structurale, pe lîngă hemoglobina normală se va sintetiza şi hemoglobina anormală respectivă. În cazul mutaţiei ambelor gene structurale de pe cromozomii omologi, hemoglobina normală nu se va mai sintetiza de loc. În sfîrşit, în cazul a două mutaţii structurale diferite, se vor sintetiza patru hemoglobine.

★

Hemoglobinopatiile, maladii ereditare cu leziuni la nivel molecular, sînt explicate astăzi pe baza mutaţiilor intervenite la nivelul genelor structurale sau al genelor reglatoare care dirijează controlul genetic al sintezei hemoglobinei. În primul caz, ca urmare a mutaţiei genei structurale, se sintetizează o hemoglobină cu structură diferită de cea normală; în cel de-al doilea, afectarea genei reglatoare se traduce printr-o tulburare a procesului de sinteză a hemoglobinei, cu o schimbare a raportului dintre fracţiunile hemoglobinice normale [2], [6], [20], [21].

Din numărul mare de hemoglobinopatii existente, cîteva prezintă o importanţă deosebită, prin incidenţa mare în care se găsesc, precum şi prin anemiile ce le pot dezvolta. Din acest motiv, ele sînt desemnate adesea sub numele de hemoglobinopatii majore. Sînt cuprinse în acest grup hemoglobinoza S, talasemia, hemoglobinoza C, hemoglobinoza E. Celelalte hemoglobinopatii sînt rar întîlnite şi nici nu prezintă manifestări clinice semnificative.

Datele actuale arată că hemoglobinozele sînt legate, în genere, de anumite zone geografice şi anumite rase de populaţie. Se ştie astăzi că incidenţa cea mai crescută a talasemiei se găseşte la popoarele din jurul

bazinului mediteranean, că hemoglobinoza S formează o centură în Africa ecuatorială, cunoscută sub numele de centura siclemică, că hemoglobinoza C este caracteristică pentru Africa de nord-vest şi se întîlneşte în special la populaţia de culoare [11], [20], [28], [38]. Cu toate acestea, apar tot mai des semnalări de hemoglobine anormale în afara acestor zone.

În ţara noastră, pînă în 1966 au fost descrise doar cîteva cazuri răzleţe de talasemie [12], [23], [36], fapt ce a făcut să se creadă că talasemia se întîlneşte la noi cu totul întîmplător. Rezultatele obţinute pe un număr mai mare de anemii [7], [8], [9], [29], [30], [32] contrazic această părere. Anemiile produse de hemoglobine anormale sau de tulburări în procesul de sinteză al hemoglobinei sînt frecvente în ţara noastră. În plus, datele obţinute arată că în ţara noastră se întîlnesc hemoglobinoze considerate specifice continentului african şi populaţiei de culoare neagră [9], [10], [31].

Din cele 770 de cazuri examinate, în marea majoritate anemii hemolitice, 300 au fost etichetate ca hemoglobinopatii, cauzate fie de tulburări în procesul de sinteză al hemoglobinei, fie de prezenţa hemoglobinelor anormale. Ele se pot grupa astfel:

talasemii = 288 cazuri, din care 243 heterozigote şi 45 homozigote
hemoglobinoză S heterozigotă = 2 cazuri
" C " = 4 "
asociere talasemie + hemoglobinoză S = 2 cazuri
" " + " C = 1 caz
methemoglobinemii congenitale (Hb M) = 2 cazuri
hemoglobinoză cu hemoglobină rapidă = 1 caz

Din cele de mai sus, rezultă că talasemia se întîlneşte frecvent în ţara noastră. Chiar dacă cifrele prezentate nu se pretează la o interpretare statistică, întrucît materialul a fost oarecum selecţionat (marea majoritatea cazurilor fiind anemii hemolitice), totuşi ele sînt suficient de convingătoare în ceea ce priveşte existenţa unei incidenţe crescute a acestei maladii.

Împărţirea cazurilor în forme hetero- sau homozigote, în funcţie de valoarea Hb A_2 şi Hb F (vezi fig. 2 *a* şi *b*), precum şi de prezenţa tarei la unul sau ambii părinţi, scoate în evidenţă faptul că formele homozigote se întîlnesc în special la vîrstele mici, foarte puţine fiind cazurile ce depăşesc vîrsta copilăriei, în timp ce formele heterozigote se întîlnesc la toate vîrstele. În materialul examinat, din cei 45 de homozigoţi, 39 au fost sub 15 ani şi doar 6 au depăşit această vîrstă (vezi fig. 2 *c*). Aceasta se explică prin anemia gravă pe care o fac aceste forme şi datorită căreia majoritatea bolnavilor mor înainte de a atinge vîrsta adultă.

Formele heterozigote, prezentîndu-se ca forme uşoare de anemie sau chiar fără nici o manifestare clinică de boală, se întîlnesc la toate vîrstele (vezi fig. 2 *c*).

Dacă formele homozigote, prin manifestările lor, pot fi diagnosticate şi pe baza semnelor clinice şi a examenelor de laborator, pentru formele heterozigote examenul electroforetic al hemoglobinei este singurul în măsură să permită precizarea diagnosticului. Este cunoscut faptul că ceea ce caracterizează aproape în totalitate aceste forme este prezenţa Hb A_2 în concentraţii crescute.

Întrucît menținerea talasemiei într-o populație dată se realizează tocmai de aceste forme heterozigote, problema depistării acestora prezintă importanță socială.

Focarele de hemoglobinoză S sînt limitate, în Europa, la țărmul nordic al Mediteranei, în special Grecia, Italia, Turcia. În Grecia au fost descrise focare cu incidență de 32%. În celelalte țări ale Europei, ea nu a fost semnalată [6], [11], [20], [28], [38].

Manifestările clinice ale anemiei drepanocitare sînt consecința directă a solubilității scăzute a Hb S. Această solubilitate scăzută este răspunzătoare de fenomenul de siclizare, de creșterea viscozității sîngelui dezoxigenat, de creșterea fragilității mecanice, de scurtarea duratei de viață a eritrocitelor respective. În forma heterozigotă, boala nu se manifestă, deși 30 — 40% din hemoglobină este reprezentată de Hb S [6], [20], [26], [28], [31], [38].

În materialul examinat am întîlnit 4 cazuri de hemoglobinoză S, primele semnalate la noi în țară, provenind dintr-o singură familie. Două dintre ele au fost heterozigote, iar celelalte două au prezentat o asociere de hemoglobinoză S cu talasemie (vezi fig. 3 *a*).

Formele heterozigote care aveau 37 și respectiv, 38,7% Hb S nu au prezentat nici o manifestare clinică și au fost depistate cu ocazia anchetei familiei respective, anchetă pornită de la un alt membru al familiei, care prezenta o anemie hemolitică.

Asocierea drepanocitozei cu talasemia la două din cazuri a determinat apariția anemiei într-o formă evidentă, ceea ce a făcut ca unul dintre ele să fie splenectomizat, iar celălalt să fie internat de 4 ori în decurs de 3 ani, din cauza unor episoade hemolitice.

De subliniat este faptul că, deși cele două tare moștenite de bolnavi, proveneau fiecare de la cîte un părinte (vezi fig. 3 *d*) (forme neinteractive), comportarea clinică și raportul Hb S/Hb A au fost exact ca în situația cînd ele ar fi fost moștenite de la un singur părinte. Altfel spus, după modul cum au moștenit cele două tare, se încadrează în formele neinteractive de asociere, iar după starea clinică și raportul hemoglobinelor în formele interactive.

Descoperirea acestor cazuri de drepanocitoză la noi în țară arată că maladia considerată specifică anumitor zone geografice poate fi întîlnită și în alte regiuni. Problema capătă însă o importanță mai mare dacă este privită sub aspectul corelației ce există între hemoglobinoza S și malarie. Purtătorii de Hb S au o rezistență crescută față de malarie în raport cu indivizii normali, ceea ce explică incidența crescută a acestor hemoglobinopatii în zonele impaludate. Transpusă la situația țării noastre, unde au existat focare de malarie foarte puternice, semnalarea acestor prime cazuri poate justifica utilitatea unor studii ulterioare.

Hemoglobinoza C are o arie de răspîndire mai mică decît a drepanocitozei și este localizată la partea de vest a continentului african. Frecvența în această regiune ajunge pînă la 25%. În continentul american, incidența este mai scăzută, fiind legată de originea vest-africană a populației de culoare. În Asia și Europa, maladia este absentă [6]. Ea nu a fost descrisă decît rar la subiecții de culoare albă.

În ceea ce privește forma de manifestare a bolii, maladia, chiar sub forma homozigotă, este mai puțin gravă decît anemia Cooley sau anemia drepanocitară.

În materialul examinat am găsit 5 cazuri de hemoglobinoză C, 4 din ele fiind forme heterozigote, iar un caz dublu heterozigot, hemoglobinoză C + talasemie (vezi fig. 4 *a*). Acestea sînt, de asemenea, primele semnalări în ţara noastră. Cazurile găsite de noi le considerăm interesante, întrucît subiecţii sînt de rasă albă, iar în generaţiile anterioare ale familiei nu se cunosc înrudiri cu persoane de origine străină.

Deşi cantitatea de Hb C la formele heterozigote a fost de 37%, 38% şi, respectiv, 42%, aceasta nu a determinat nici o manifestare clinică. Asocierea hemoglobinozei C cu talasemia la unul din membrii familiei a determinat apariţia unei anemii moderate, iar valorile hemoglobinei C au fost de 83,5%.

Ca şi la asocierea Hb S + talasemie, şi în cazul de faţă, deşi cele două maladii proveneau de la cei doi părinţi (vezi fig. 4 *c*), s-a constatat fenomenul de interactivitate între talasemie şi hemoglobinoză C cu inversarea raportului Hb A/Hb patologică.

Deşi methemoglobinemiile congenitale cauzate de prezenţa hemoglobinei M sînt rar întîlnite, socotim utilă o scurtă prezentare a acestei maladii, dată fiind dificultatea precizării diagnosticului.

Caracteristică pentru hemoglobinele M este uşurinţa cu care acestea trec în methemoglobine M, prin oxidarea atomului de fier, pierzînd prin aceasta valoarea lor de pigment respirator.

În organismul uman, o cantitate de hemoglobină se transformă permanent, în methemoglobină, dar aceasta este redusă de sisteme enzimatice specializate şi ea nu depăşeşte în mod normal 2% din hemoglobina totală.

În prezenţa anumitor substanţe toxice sau în cazul unor deficite enzimatice, cantitatea de methemoglobină poate creşte peste valorile întîlnite în mod obişnuit, determinînd methemoglobinemii toxice sau prin deficit enzimatic, care se exteriorizează prin cianoză şi insuficienţă respiratorie.

Methemoglobinemiile toxice dispar prin îndepărtarea agentului toxic, iar la cele prin deficit enzimatic cantitatea de methemoglobină scade după administrarea anumitor substanţe reducătoare, ca acidul ascorbic, albastrul de metilen, dar se reface la încetarea administrării. Methemoglobina provenită din Hb M nu poate fi redusă nici de sistemele enzimatice specializate în acest sens şi nici de anumite substanţe reducătoare. De aceea, în cazul unei methemoglobinemii, precizarea agentului cauzal este foarte importantă.

Prezenţa methemoglobinei peste anumite limite pune diagnosticul de methemoglobinemie. Analiza spectrală a sîngelui respectiv dă o indicaţie în plus, întrucît methemoglobina provenită din Hb A (agenţi toxici, deficit enzimatic) are o bandă de absorbţie specifică la 632 milimicroni, în timp ce methemoglobina provenită din Hb M are o bandă de absorbţie la 610 — 617 — 620 milimicromi, în funcţie de tipul de Hb M[1] (vezi fig. 5 *a*).

Reacţia de reducere a methemoglobinei în prezenţa anumitor agenţi reducători permite, de asemenea, excluderea deficitului enzimatic, întrucît methemoglobina M nu poate fi redusă şi, în probele respective, vom

[1] Pînă în prezent au fost descrise mai multe hemoglobine M cu spectre de absorbţie diferite, însă toate mai mici de 632 milimicroni.

constata totdeauna, prezența unei cantități de methemoglobină nereductibile (vezi fig. 5 *b*).

În sfîrșit, la electroforeza în gel de amidon, pH 7,08, hemoglobina M se separă ca o componentă cu mobilitate mai lentă (vezi fig. 5 *c*), iar analiza spectrală a spotului respectiv ne confirmă prezența Hb M [13].

Precizarea catenei anormale și a aminoacidului substituit, care se poate face prin hibridare și „finger print", nu este justificată decît în cazurile unei caracterizări chimice definitive, pentru diagnostic fiind suficientă evidențierea Hb M.

În materialul examinat, 10 cazuri au prezentat valori de methemoglobină între 7 și 23,60%. Analiza spectrală, cinetica reacției de reducere a methemoglobinei și electroforeza ne-au permis să etichetăm ca methemoglobinemii congenitale, cauzate de Hb M, doar două dintre ele. Valorile de methemoglobină au fost de 19,70% și, respectiv, 23,60%, iar benzile de absorbție au fost la 617 milimicroni, respectiv 620 milimicroni.

★

Din datele expuse se desprind cîteva concluzii :

— Modificări infime în structura hemoglobinei determină modificarea proprietăților fizico-chimice ale moleculei, modificări care se răsfrîng și asupra proprietăților fiziologice. Acestea sînt deosebit de evidente în cazul Hb S și Hb M. Fenomenul de siclizare în cazul drepanocitozei (vezi fig. 3 *c*) și susceptibilitatea deosebit de marcată la oxidare a Hb M sînt consecința substituției unui aminoacid într-una din catenele moleculei respective.

— Manifestările clinice și hematologice fiind urmarea unei modificări intervenite la nivelul moleculei de hemoglobină, hemoglobinozele se încadrează în grupa maladiilor cu leziuni la nivel molecular.

— În țara noastră, anemiile hemolitice cauzate de hemoglobine anormale sau de dereglări în procesul de sinteză al hemoglobinei sînt relativ frecvente. Deși materialul nu este omogen și nu se pretează la o apreciere statistică, totuși numărul mare de cazuri pozitive în materialul examinat pledează în acest sens. În sprijinul unei incidențe crescute vin și cazurile dublu heterozigote întîlnite.

— Talasemia este cel mai des întîlnită, și în special forma de β-talasemie specifică bazinului mediteranean.

Celelalte hemoglobinopatii, ca hemoglobinoza S, hemoglobinoza C, par să fie mai rare, ele întîlnindu-se într-o frecvență crescută în anumite zone geografice și, îndeosebi, la populația de culoare.

— În explicarea existenței hemoglobinopatiilor în populația țării noastre, trebuie luate în considerație :

a) poziția geografică a țării noastre în vecinătatea bazinului mediteranean ;

b) posibilitatea amestecului populației autohtone cu popoare la care hemoglobinopatiile se găsesc într-o frecvență crescută (turci, greci) și, în special, aportul însemnat adus de elementul roman în formarea poporului român.

În ceea ce privește hemoglobinoza S, merită să fie urmărită și în țara noastră corelația dintre această maladie și malarie în localitățile

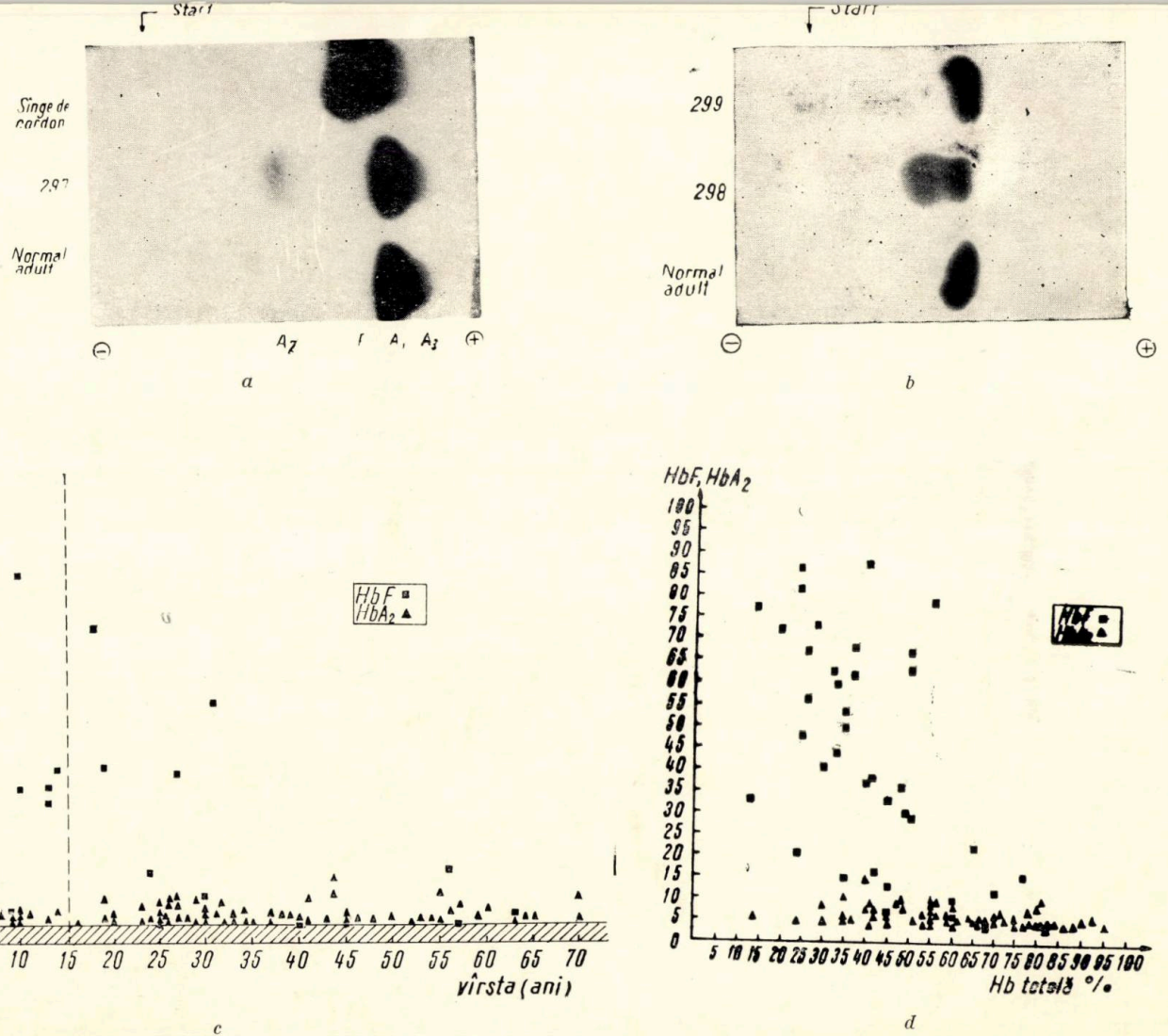
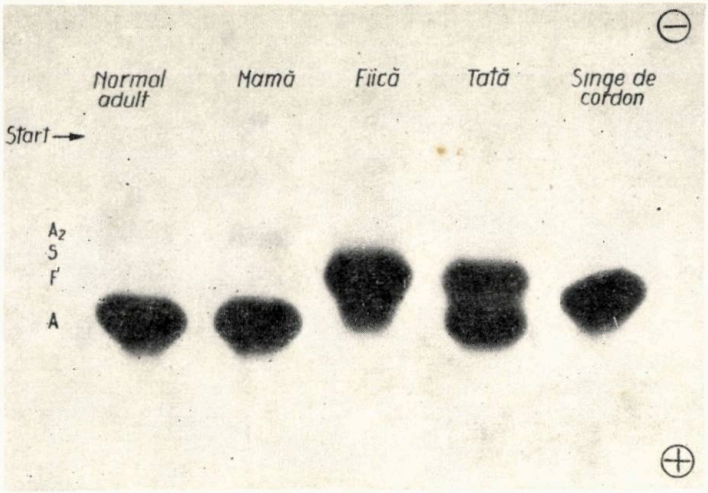
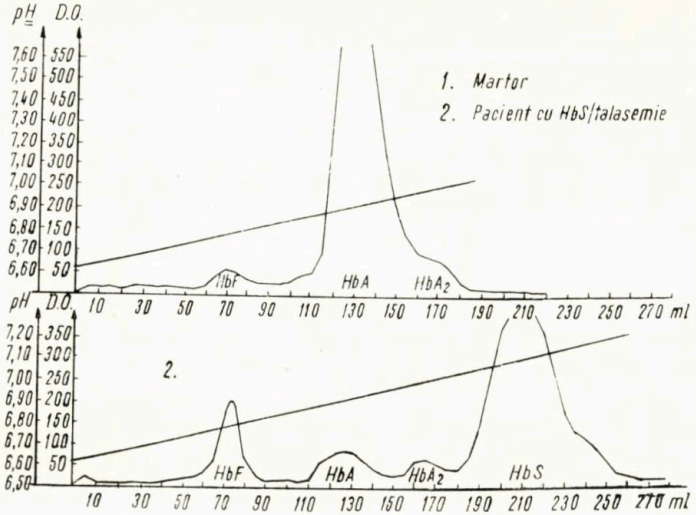


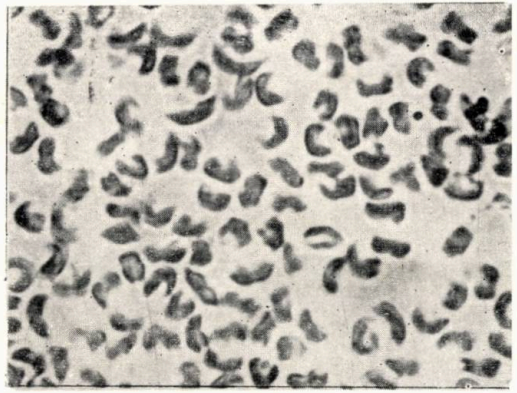
Fig. 2. *a* — Electroforeza hemoglobinei unui pacient cu Hb A_2 crescută. *b* — Electroforeza unui pacient cu Hb F crescută. *c* — Corelaţia dintre vîrstă şi cantitatea de Hb F, respectiv Hb A_2. *d* — Corelaţia dintre gradul de anemie (hemoglobina totală) şi valorile Hb F, respectiv Hb A_2.



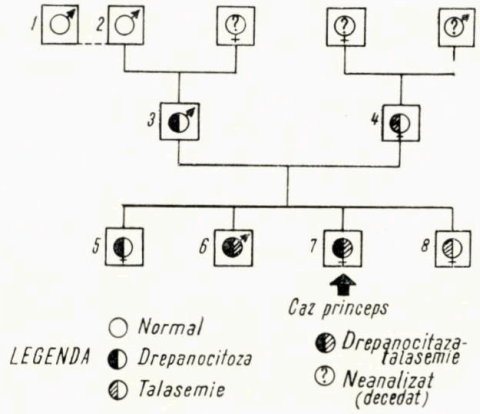
a



b

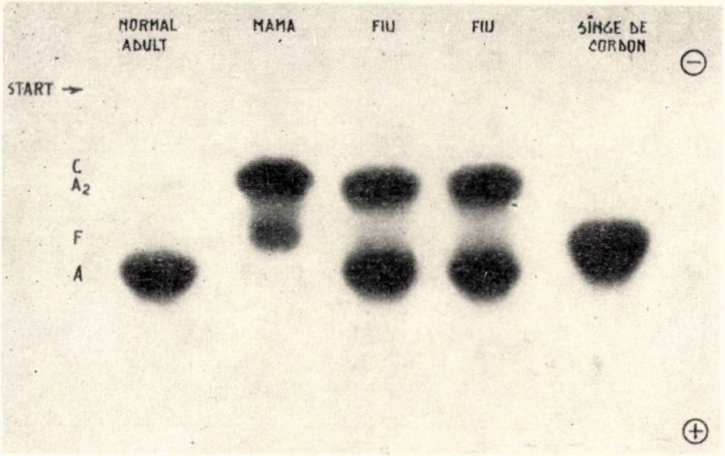


c

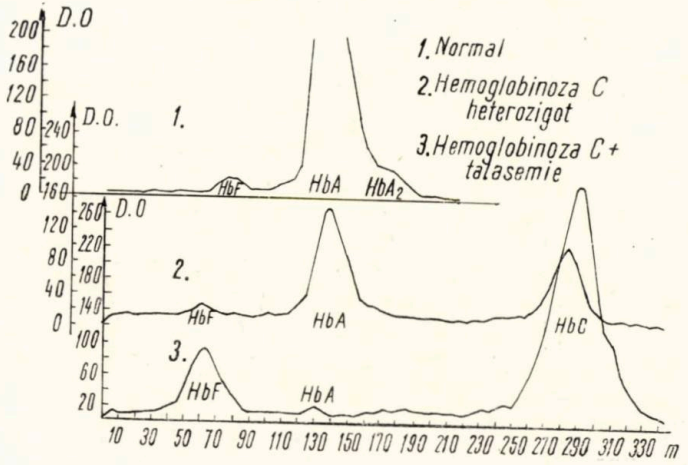


d

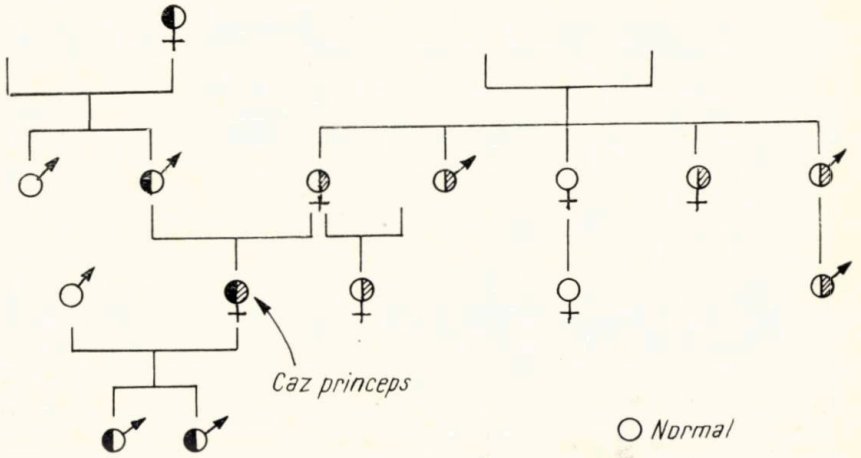
Fig. 3. *a* — Electroforeza hemoglobinei la trei membri ai unei familii (mama — talasemie heterozigotă, tata — hemoglobinoză S—heterozigot, fiica — asociere henoglobinoză S + talasemie). *b* — Cromatografia pe CM-Sephadex, în gradient continuu de pH, a hemoglobinei pacientului cu asociere Hb S+talasemie. *c* — Hematii siclizate după tratare cu metabisulfit de sodiu. *d* — Arborele genealogic al unei familii cu hemoglobinoză S.



a

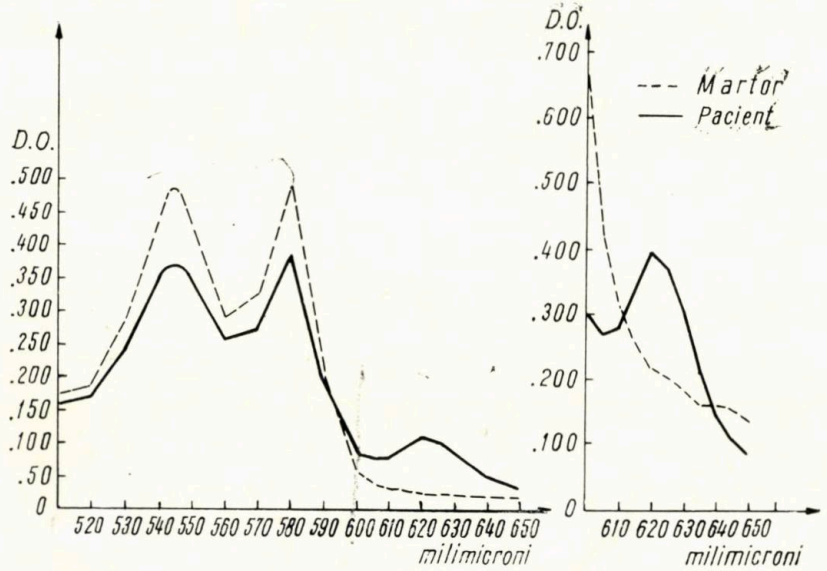


c

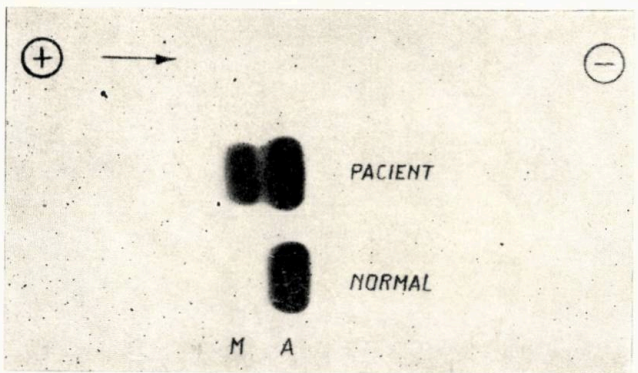


b

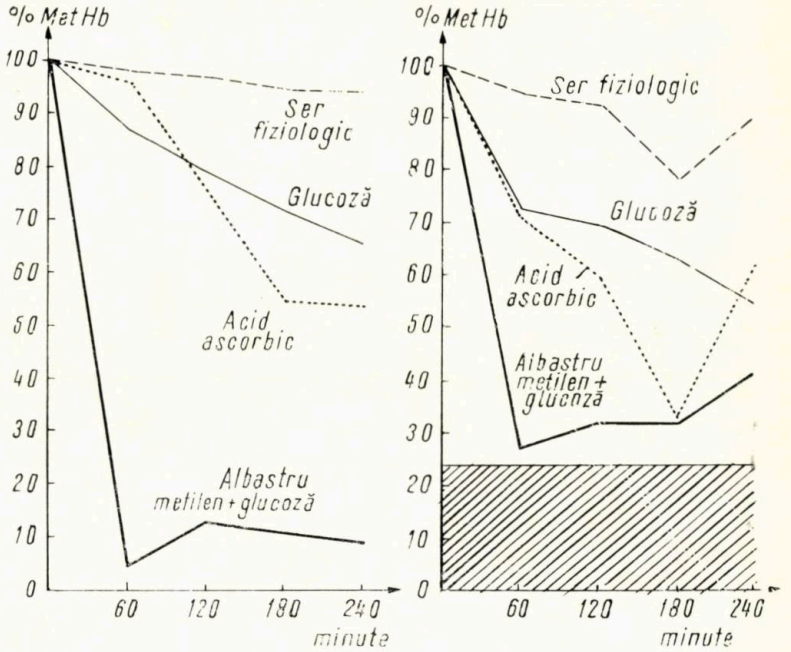
Fig. 4. *a* — Electroforeza hemoglobinei a trei pacienţi cu hemoglobinoză C (mama — asociere hemoglobinoză C + talasemie, cei doi fii — hemoglobinoză C — heterozigoţi). *b* — Cromatografia pe CM-Sephadex, în gradient continuu pe pH a hemoglobinei a doi pacienţi cu hemoglobinoză C. *c* — Transmiterea tarei în familia cu hemoglobinoză C.



a



c



b

Fig. 5. *a* — Spectrul hemolizatului unui pacient cu methemoglobinemie congenitală (absorbţie specifică la 617 milimicroni). *b* — Cinetica reacţiei de reducere a methemoglobinei într-un caz cu methemoglobinemie congenitală (Hb M). *c* — Electroforeza hemoglubinei unui pacient cu methemoglobinemie congenitală (Hb M).

puternic impaludate în trecut, cunoscută fiind relaţia dintre *Plasmodium falciparum* şi hemoglobinoza S în zonele cu incidenţă crescută pentru drepanocitoză.

— Frecvenţa relativ crescută a hemoglobinopatiilor în cadrul anemiilor hemolitice şi posibilitatea de confuzie cu alte anemii impun studiul hemoglobinelor pentru precizarea diagnosticului şi aplicarea tratamentului corespunzător.

Prezentată la redacţie
la 9 aprilie 1968

Laboratorul de biochimie,
Centrul de hematologie,
Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. Baglioni C., Ingram M. V., Biochim. biophys. Acta, **48**, 253 (1961).
2. Baglioni C., *Correlations between genetics and chemistry of human hemoglobin*, în *Molecular Biology*, Part. I, chapter IX, Academic Press, New York, 1963.
3. Baglioni C., Lehman H., Nature, **196**, *4851*, 229 (1962).
4. Bartolozzi G., Marianelli L., Acta haemat., **35**, 214 (1966).
5. Benzer S., Ingram M. V., Lechmann H., Nature, **182**, 852 (1958).
6. Bernard J., Ruffié J., *Hématologie Géographique*, Ed. Masson et Cie, Paris, 1966.
7. Bratu V. Predescu C., Teitel P., Docum. haemat., *2* (1966).
8. Bratu V., Predescu C., Teitel P., St. cerc. med. int., **8**, 263 (1967).
9. Bratu V., Predescu C., Bălan Angela, Prişcu R., Rev. roum. Med. int., *1* (1968).
10. Bratu V., Predescu C., Roitman Nina, St. cerc. med. int., *1* (1968).
11. Fessas Ph., *Thalassemia and the alteration of the haemoglobin pattern.* în *Abnormal Haemoglobins, A Symposium*, Blackwell, Oxford, 1959.
12. Fodor O., Surianu P., Marin Fl., Med. int., *6*, 907 (1960).
13. Gerald P. S., Blood, **13**, 936 (1958).
14. Huisman T., Martise, Dozy A., Groningen M., J. Lab. clin. Med., **2**, 312 (1958).
15. Huisman T., Dozy M.A., Harton F. B., Nechtman M. C., J. Lab. clin. Med., **67**, *3*, 355 (1966).
16. Hunt A.J., Ingram M. V., Biochim. biophys. Acta, **42**, 409 (1960).
17. Ingram M. V., Biochim. biophys. Acta, **28**, 3 (1958).
18. Ingram M. V., Nature, **178**, 792 (1956).
19. Lehmann H., Huntsman G. R., *Haemoglobin and myoglobin*, în *Comprehensive Biochem.*, Elsevier, Amsterdam — Londra — New York, 1963, p. 55.
20. Lehmann H., Hustman G. R., *Man's haemoglobins*, North Holland Publ. Comp., Amsterdam, 1966.
21. Lehmann H., Traverse M. P., Ann. Biol. clin. **56**, 401 (1962).
22. Kendrew S. J., Biofizika, **8**, 3 (1963).
23. Kondi V., Bălan St., Iacobescu A., Med. int., **1**, 129 (1959).
24. Kunkel H. G., Wallenius G., Science, **122**, 288 (1955).
25. Neel V. J., Blood, **18**, 769 (1961).
26. Pauling L., Itano H. A., Singer S. J., Wells I. C., Science, **110**, 543 (1949).
27. Perutz M. F.., Biofizika, **9**, 1 (1964).
28. Popescu R. E., *Hematologie clinică*, Edit. medicală, Bucureşti, 1966, p. 306.
29. Predescu C., Bratu V., Teitel P., Pediatria, *2*, 109 (1967).
30. Predescu C., Bratu V., Ionescu V., Docum. haemat., *2*, 115 (1967).
31. Predescu C., Bratu V., Bălan Angela, Prişcu R., Pediatria, *6*, 531 (1967).
32. Predescu C., Bratu V., Teitel P., A II-a Conferinţă naţională de hematologie, Bucureşti, 9—11 noiembrie 1967.
33. Rosa J., Dreyfus C. J., Schapira G., Nouv. Rev. franç. Hémat., *4*, *3*, 353 (1964).
34. Schroeder W., Annu. Rev. Biochem., **32**, 301 (1963).
35. Soru E., *Biochimie medicală*, Edit. medicală, Bucureşti, 1963, p. 321, 1296.
36. Zălaru C. M., Vineş Ortensia, Udrea T., Viaţa medicală, **12**, *3*, 117 (1965).
37. Zuckerkandl E., Scientific American, **5**, 110 (1965).
38. Wintrobe M. M., *Clinical Hematology*, Lea and Febiger, Philadelphia, 1961, p. 689.

H. SACHSSE, *Die Erkenntnis des Lebendigen* (*Cunoaşterea viului*), Friedr. Vieweg und Sohn, Braunschweig, 1968, 289 p., 23 tab., 35 fig.

În această carte, autorul, profesor la Universitatea din Mainz, caută să dea un răspuns la o serie de probleme pe care le ridică progresele rapide ale biologei moderne.

Multitudinea acestor probleme, privite de pe poziţii filozofice diferite, originalitatea gîndirii, precum şi limbajul accesibil şi curgător fac ca această carte să fie citită cu interes, chiar dacă cititorul nu este de acord cu unele afirmaţii ale autorului.

Cartea cuprinde o introducere privind problema naturii viului, apoi două părţi principale, dintre care una se referă la echilibrul de curgere (7 capitole), iar cealaltă la reproducerea şi dezvoltarea formelor vii (8 capitole), o încheiere relativă la problema lumii în sine şi a lumii pentru noi, o listă bibliografică în care sînt citate 139 de lucrări, un glosar al termenilor de specialitate şi un registru alfabetic.

Titlurile capitolelor arată limpede conţinutul cărţii, şi anume: Ce este cibernetica? Informaţia ca mărime măsurabilă. Sisteme reglate. Dirijarea şi programul. Ce înseamnă învăţarea? Dirijarea antagonistă a echilibrelor fiziologice. Perspectivele şi limitele aplicării cibernetici în biologie. Observaţii privitoare la modul de privire cauzal şi finalist. Sufletul ca purtător al vieţii. Evoluţia în lumina materialismului dialectic. Creşterea şi ereditatea văzută din punctul de vedere al teoriei informaţiei. Despre direcţia proceselor în natură şi noţiunea timpului. Evoluţia. Observaţii privitoare la cunoaştere. Omul în natură şi omul faţă de natură.

Acad. Eugen Macovschi
Institutul de biochimie al Academiei
Republicii Socialiste România

Biochemical Preparations (*Preparate biochimice*), vol. 12, sub red. W.E.M. LANDS, John Wiley and Sons, Inc., New York—Londra—Sydney, 1968, 152 p.

Deoarece aceeaşi editură a mai publicat o colecţie de „Sinteze organice" şi una de „Sinteze anorganice", în lucrarea *Preparate biochimice* se pune accentul pe izolarea şi nu pe sinteza substanţelor de uz biochimic. Volumul descrie metodele de obţinere în stare pură a 26 de substanţe: sedoheptulozo-7-fosfatul, dermatan-sulfatul, heparina, fibrinogenul, un derivat polianionic al tripsinei, insolubil în apă, un inhibitor al tripsinei şi α-chimotripsinei, d-amino-oxidaza din rinichi de porc, mioglobina de caşalot, proteina mitocondrială structurală din inima de bou, proteina transportoare de resturi acil din *Escherichia coli*, complexul coenzimă A — S acil cu catenă lungă, radioactiv, acil-carnitine cu catenă lungă, fosfogliceridele etanolaminei, acidul estriol-16-glucoziduronic, 20 α (şi 20 β)-hidroxi-pregn-4-en-3-ona, S-benzhidril-L-cisteina, acidul chorisimic, glicil-L-aspartil-L-seril-glicina, ureea marcată cu C^{13}, citidin- 2′, 3′ -fosfatul ciclic de potasiu, acidul ribonucleic din virusul mozaicului tutunului, 5-dezoxipiridoxalul, aquocobalamina, 5′-dezoxiadenozilcobalamina, metilcobalamina.

Pentru fiecare dintre aceste substanţe este descrisă în amănunţime tehnica de izolare, dîndu-se un bogat material bibliografic. De asemenea, sînt prezentate proprietăţile respective, tehnici de purificare, indici de apreciere a purităţii, precum şi tehnici de testare (dacă este cazul).

În volum sînt date formulele chimice şi greutăţile moleculare ale substanţelor în cauză, scheme de separare, tabele cu constante, schemele unor căi metabolice, grafice, desenele unor aparate. În final, este dat şi un index de subiecte, foarte cuprinzător.

Considerăm că acest volum este foarte util pentru cei care lucrează în domeniul biochimiei preparative.

Florin Mihăilescu
Institutul de biochimie al Academiei
Republicii Socialiste România

A. C. GIESE, *Cell Physiology* (*Fiziologia celulei*), ed. a 3-a, W. B. Saunders Company, Philadelphia, 1968, 671 p.

Poate cea mai fundamentală dintre proprietăţile sistemelor vii este existenţa pe principiul celulei, unitate de bază nu numai din punct de vedere structural, ci şi funcţional. Numitorul comun necesar activităţilor indispensabile ale organismelor vii este, fără îndoială, celula, şi nu complexul de organe şi sisteme dezvoltate la plantele şi animalele pluricelulare. Viaţa organismelor depinde în ultimă analiză de funcţionarea celulelor componente, înţelegerea fiziologiei celulare fiind piatra de încercare a tuturor celorlalte studii de fiziologie. În acest context, publicarea unui vast material care îmbină multiplele aspecte ale vieţii celulei într-o expunere armonios dimensionată este mai mult decît bine venită.

Lucrarea începe cu o scurtă prezentare a scopurilor fiziologiei celulare şi a aplicării legilor termodinamicii la celulă. Bogatul material al tratatului este împărţit în 7 părţi. Prima parte, tratînd despre organizarea funcţională a celulei, conţine date asupra morfologiei şi biochimiei celulare, proprietăţilor coloidale ale celulelor, structurii şi funcţiei organelor intracelulare şi a nucleului (5 capitole). Partea a doua se axează pe prezentarea unor factori ai mediului înconjurător celular, şi anume : apa, gazele, presiunea, electroliţii, radiaţiile, temperatura (4 capitole). Partea a treia urmăreşte problema schimbului diverselor materiale prin membranele celulare, a căror natură chimică şi structură detaliată sînt descrise. Astfel, sînt trecute în revistă procesele de osmoză, mişcarea unor substanţe prin membrane, ca răspuns la gradienţi de concentraţie, transportul legat de metabolism şi pinocitoză (4 capitole). Partea a patra se ocupă de transformarea materiei şi energiei în celulă, tratînd problema enzimelor celulare, a eliberării de energie, a potenţialelor de oxido-reducere, a respiraţiei, fermentaţiei, luminescenţei, fotosintezei, biosintezei, reglării şi controlului metabolic (7 capitole). Partea a cincea, intitulată excitabilitate şi contractilitate, discută problema potenţialelor de acţiune, a dezvoltării şi propagării lor, a contractilităţii şi bazei sale chimice (4 capitole). Partea a şasea (2 capitole) este consacrată creşterii şi diviziunii celulare. Partea a şaptea, şi ultima, conturează tendinţele fiziologiei celulare.

Fiind la a treia ediţie, lucrarea este completată cu ultimele dezvoltări ale fiziologiei şi biochimiei în problemele tratate. Bibliografia care însoţeşte fiecare capitol este bine aleasă, conţinînd, pe lîngă indicaţii clasice, şi multe lucrări recente şi foarte recente. Consultarea trata-

tului este ușurată de un index de subiecte. Valoarea lucrării este mult crescută prin faptul că textul este însoțit de un bogat material ilustrativ (fotografii, diagrame, grafice, scheme, tabele).

Dita Cotariu
Institutul de biochimie al Academiei
Republicii Socialiste România

The interaction of drugs and subcellular components in animal cells (*Interacțiunea medicamente — componenți subcelulari în celulele animale*), sub red. P. N. CAMPBELL, J. and A. Churchill Ltd., Londra, 1968, 355 p.

Acest volum cuprinde lucrările unui simpozion privind modul de acțiune a medicamentelor, ținut la Londra în zilele de 10 și 11 aprilie 1967, sub auspiciile Comitetului biologic britanic.

Cercetările prezentate au fost întreprinse cu scopul de a identifica formațiunile celulare afectate primar de un medicament sau altul, subliniindu-se mai ales aspectele biochimice — și mai puțin cele farmacologice — ale interacțiunii medicament — particulă celulară. Lucrările simpozionului s-au desfășurat în patru secțiuni, în legătură cu principalele organite celulare — nucleu, microzomi, mitocondrii, lizozomi —, care pot fi afectate specific de o clasă de medicamente sau alta.

Mecanismul de acțiune al agenților alchilanți și al antibioticelor asupra ADN-ului, precum și efectele înlocuirii unor baze din ADN cu derivați sintetici ai purinei sau pirimidinei fac obiectul primei părți (autori Roberts și colab., Rees și Prusoff).

Chappell și colab., Orrenius, Korner, Weisberger au contribuit la acest simpozion cu lucrări privind acțiunea unor medicamente asupra permeabilității membranelor mitocondriale, stimularea de către amobarbital a metabolismului steroizilor, interferența puromicinei și a cloramfenicolului cu sinteza proteinelor.

După ce de Duve discută potențialitățile lizozomilor ca țintă pentru diverse medicamente, alți autori ilustrează interacțiunea mutuală dintre lizozomi și medicamente prin efectele coloranților bisazoici (Lloyd și colab.), ale medicamentelor antiinflamatorii (Weissman), precum și a altora (Allison).

În ultima parte, Smith, Potter și Dean își aduc contribuția la acest volum prin prezentarea unor particule celulare specializate în depozitarea și secretarea de substanțe cu acțiune hormonală.

Materialul interesant și actual, bine ilustrat, precum și autoritatea colaboratorilor fac ca lectura acestui volum să fie plăcută și utilă. Cartea este recomandată celor care studiază medicamentele în sine, dar și celor angajați în cercetarea structurii și funcțiunii componenților celulari.

Elena Cristea
Catedra de biochimie,
I.M.F., București

Regulatory functions of biological membranes (*Funcțiile de reglare ale membranelor biologice*), vol. 11, sub red. J. JÄRNEFELT, Elsevier, B.B.A. Library, Amsterdam — Londra — New York, 1968, 311 p.

În acest volum sînt incluse majoritatea lucrărilor prezentate la simpozionul ținut la Helsinki în noiembrie 1967, cu privire la structura și funcția membranelor celulare. Ele aduc rezultate asupra compoziției morfologice și chimice a membranelor, asupra aranjării unora față de altele a diferitelor componente și asupra mecanismelor transportului activ și ale reacțiilor energetice în membranele celulare și în mitocondrii. Au fost de față la acest simpozion oameni de știință de cele mai diverse specialități, angajați în studierea membranelor sub cele mai diferite aspecte.

Parte din articole sînt expuneri de sinteză a propriilor lucrări, încadrate în cercetările recente din același domeniu, ca de exemplu : F.S. Sjöstrand, Structura moleculară și funcția membranelor celulare ; F.L. Crane, Organizarea moleculară a cristelor mitocondriale ; S. Papa și colab., Controlul energetic al utilizării substratului în mitocondrii ; L. van Deenen, Lipidele membranelor ; G.F. Azzone, Cuplarea osmotică în translocarea ionilor ; D.F. Hoelzl Wallach și A.S. Gordon, Interacțiuni lipide-proteine în membranele celulare ; B. Hess și A. Boiteux, Controlul glicolizei ; R.L. Post, Pompa de sodiu a membranelor celulei animale.

Cîteva lucrări se ocupă de rolul aldosteronului în transportul sodiului (D.D. Fanestil și colab., G.W. G. Sharp și colab., G. Rousseau și colab.), alte cîteva de membranele sistemului fotosintetic (L.P. Vernon și colab., A.R. Crofts și colab., M. Baltscheffsky).

Prin contribuțiile pe care le aduce, volumul este de un real folos specialiștilor.

Poate că publicarea și a discuțiilor pe marginea fiecărei lucrări ar fi adus volumului o lumină în plus.

Cecilia Motaș
Institutul de biochimie
al
Academiei Republicii Socialiste România

WILHELM EICKHOFF, CLAUS HERBERHOLD, *Die Lymphbahnen der menschlichen Schilddrüse* (*Căile limfatice ale glandei tiroide umane*), Springer Verlag, Berlin—Heidelberg — New York, 1968, 111 p., 32 ilustrații.

Acest volum, al 24-lea din seria „Medicină experimentală, patologie și clinică", este o monografie asupra căilor limfatice ale tiroidei umane. În cele 7 capitole ale cărții, autorii au rezumat 307 articole de specialitate. După o privire de ansamblu asupra sistemului limfatic, se arată tehnicile de evidențiere și cercetare a căilor limfatice tiroidiene. În alte două capitole este studiat sistemul limfatic intra- și cel extratiroidian. Într-o altă secțiune sînt prezentate cîteva informații privitoare la analiza roentgenografică a căilor limfatice tiroidiene și cervicale. Se face apoi un studiu asupra volumului și conținutului vaselor limfatice, se dau date privitoare la debitul vaselor limfatice, la presiunea limfei, la conținutul în celule, aminoacizi, aminoacizi iodurați și alți compuși necunoscuți în cele două tipuri de vase limfatice. Ultimul capitol este consacrat importanței sistemului limfatic. Se discută rolul limfocrin al tiroidei, importanța ei în stările de stress.

Volumul este completat cu o listă bibliografică, o listă de ilustrații și un index de subiecte.

Prin abundența materialului prezentat și prin concizia stilului, volumul de față se înscrie printre lucrările valoroase de tiroidologie.

Constanța Mușolan
Institutul de biochimie
al
Academiei Republicii Socialiste România

Handbuch der experimentellen Pharmacologie, vol. XIV, partea a 3-a : *The Adrenocortical Hormones (Tratat de Farmacologie experimentală*, vol XIV partea a 3-a; *Hormonii Adrenocorticali)*, Springer Verlag, Berlin — Heidelberg — New York, 1968, 452 p., 36 fig.

Volumul XIV din *Handbuch der experimentellen Pharmacologie* cuprinde partea a 3-a a unei monografii, editată de H.W. Deane și B.L. Rubin, despre hormonii adrenocorticali.

Capitolul 9 (autori W.E. Ganong și E.E. van Brund) se referă la mecanismele de control ale secreției de aldosteronă. Se descriu efectele acțiunii hormonilor de creștere și ale variațiilor metabolismului aldosteronei asupra secreției de aldosteronă. O importanță deosebită se atribuie relațiilor dintre secreția de aldosteronă și sistemul nervos autonom. Un subcapitol aparte se referă la metodele folosite pentru măsurarea ratei secreției de aldosteronă.

În capitolul 10 (autor P.Z. Thomas) sînt prezentate unele manifestări ale hipersecreției de adrenosteroizi sexuali la om. Se fac referiri la testele clinice ale valorilor ce caracterizează natura patologiei corticale.

Capitolul 11 (autori J.R. Hodges, M. T. Jones și M. A. Stockham) se referă la rolul sistemului nervos simpatic, al sistemului nervos central și al corticosteroizilor în controlul secreției de corticotrofină. În capitolul 12 (autori A. H. Janoski, J. C. Shaver, N. P. Christy și W. Rosner) se expun date cu privire la acțiunea farmacologică a glucocorticoizilor adrenocortexului mamiferelor. Este analizată în amănunțime acțiunea farmacologică a glucocorticoizilor la om : asupra metabolismului intermediar, presiunii sanguine, glandelor și funcțiilor endocrine etc.

La sfîrșitul fiecărui capitol al acestei monografii se găsește o bibliografie vastă.

Prin varietatea și actualitatea problemelor abordate, lucrarea pune la îndemîna endocrinologilor, medicilor și biochimiștilor un volum larg de cunoștințe teoretice și practice.

Lucia-Doina Popov
Institutul de biochimie
al
Academiei Republicii Socialiste România

14. Symposion der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie in Heidelberg, vom 7.—9. März 1968; *Schriftleitung: Prof. Dr.* JOACHIM KRACHT. *Nebenschilddrüse und endokrine Regulationen des Calciumstoffwechsels — Spontan-Hypoglykämie — Glukagon* (*Al 14-lea Simpozion al Societății germane de endocrinologie, Heidelberg, 7—9 martie 1968: Glanda suprarenală și reglarea endocrină a metabolismului calciului — hipoglicemia spontană — glucagonul*), Springer, Berlin — Heidelberg — New York, 1968, 387 p.

Volumul cuprinde materialele simpozionului, și anume referate, comunicări libere și discuții grupate în jurul celor trei probleme mari discutate. În capitolul I, privitor la glandele suprarenale și reglarea endocrină a metabolismului calciului, se tratează probleme legate de reglarea hormonală a metabolismului calciului și fosforului, de hiper- și hipoparatiroidism, insuficiența glandei suprarenale la copii etc. Tot în acest capitol se discută și aspecte legate de tireocalcitonină, ca de pildă : locul de formare, fiziologia, patofiziologia și acțiunea la om a acestui polipeptid hormonal.

Capitolul II este consacrat hipoglicemiei spontane și tratează diferite cauze care pot duce la această afecțiune. Comunicările libere cuprinse în acest capitol se referă mai ales la folosirea metodelor imunologice în studierea diferitelor aspecte legate de insulină.

Ultimul și cel mai amplu capitol se referă la glucagon. Sînt prezentate lucrări cu privire la sinteza totală a glucagonului biologic activ și reacționabilitatea sa imunologică, rolul și importanța sa biologică, influența sa asupra gluconeogenezei și asupra metabolismului țesutului adipos, imunologia sa etc. Comunicările libere cuprinse în acest capitol tratează probleme legate de glanda tiroidă, de hipofiză și hormoni hipofizari, de glanda suprarenală și hormonii corticosuprarenali, de glandele sexuale, hormonii sexuali și antiandrogene.

Volumul cuprinde în total 91 de articole, în limbile engleză sau germană, cu numeroase indicații bibliografice și figuri și un index alfabetic, cu numele autorilor care au susținut lucrări, precum și cel al participanților la discuții, cu indicarea locului lor de muncă.

Horst D. Schell
Institutul de biochimie
al
Academiei Republicii Socialiste România

B.R. BAKER, *Design of Active-Site-Directed Ireversibile Enzyme Inhibitors* (*Studiul inhibitorilor cu acțiune ireversibilă asupra centrilor activi ai enzimelor*), John Wiley and Sons, Inc., New York — Londra — Sydney, 1967, 325 p.

În această carte, autorul, profesor de chimie la Universitatea din Santa Barbara, California, bine cunoscut datorită remarcabilelor sale cercetări din domenii biochimice variate, își expune concepțiile sale originale asupra reacțiilor prin care se formează complexele specifice dintre inhibitori și centrii activi ai enzimelor.

Materialul este împărțit în 13 capitole, tratînd numeroase aspecte referitoare la acest domeniu de cercetare deosebit de important al biochimiei moderne.

După un capitol de considerații generale, în care se expun aspectele teoretice, explicate prin exemple demonstrative, ale concepției originale a autorului asupra mecanismului de

inhibiţie (capitolele 1 şi 2), se descrie în trei capitole (cap. 3, 4 şi 5) modul specific de legare a inhibitorului de enzimă la trei categorii distincte de enzime, şi anume enzime proteolitice (chimotripsina şi tripsina), unele enzime care acţionează asupra substanţelor cu structură pirimidinică (timidin-kinaza, timidin-fosforilaza) sau purinică (succino-adenilat-kinosintetaza şi guanin-dezaminaza).

În următoarele trei capitole (cap, 6, 7 şi 8) se urmăresc aspecte variate, ca : schimbările structurale ale locurilor de legare ale enzimelor, toleranţa complexelor enzimă-substrat-inhibitor, date cinetice etc. Toate aceste aspecte sînt tratate atît din punct de vedere teoretic, cît şi prin prisma rezultatelor personale sau alese din literatura de specialitate, obţinute prin studiul unui număr mare de enzime. Se pune un accent deosebit pe relaţia dintre structura chimică a inhibitorului şi aceea a centrului activ al enzimei, precum şi pe tipul de legătură care se formează în aceste complexe.

Urmează descrierea mai amănunţită a modului în care are loc formarea complexelor enzimă-substrat-inhibitor, la următoarele enzime : lactic- şi glutamic-dehidrogenazele, dehidrofolic-reductaza, timidilat-sintetaza şi adenozin-dezaminaza (cap. 9, 10, 11 şi 12).

În ultimul capitol se descriu aspecte legate de utilizarea suporturilor cromatografice enzimo-specifice, ca DEAE- şi CM-celuloza.

Studiul amănunţit al modului în care are loc formarea complexelor dintre inhibitori, enzime şi substrate, bogata bibliografie utilizată şi, mai ales, discernămîntul şi observaţiile originale ale autorului fac ca această carte să aibă o deosebită valoare teoretică şi practică. Ea deschide noi porţi spre cunoaşterea modului de acţiune al enzimelor şi, extrapolînd, al proceselor biochimice vitale din organism.

Dinu Tănăsescu
Institutul de biochimie
al
Academiei Republicii Socialiste România

ANTHONY H. ROSE, *Chemical Microbiology* (*Microbiologie chimică*), Butterworths & Co Ltd., Londra, 1968, 312 p.

Această valoroasă lucrare a apărut recent în cea de-a doua sa ediţie, complet revăzută şi actualizată.

Cartea cuprinde 10 capitole, în care, într-o înlănţuire logică şi într-un stil concis, precis şi totodată atrăgător, sînt prezentate cunoştinţele actuale în domeniul chimiei şi biochimiei diferitelor grupe de microorganisme — bacterii, drojdii, fungi, protozoare şi alge.

După primul capitol introductiv, în care autorul scoate în evidenţă importanţa şi actualitatea cunoaşterii activităţii chimice a microorganismelor, se trece la discutarea arhitecturii moleculare a acestor vieţuitoare. Compoziţia şi structura chimică a diferitelor formaţiuni celulare şi subcelulare microbiene sînt prezentate în acest capitol în strînsă legătură cu aspectele lor morfologice.

Capitolul al treilea se referă la mediul înconjurător, la influenţa exercitată de acesta asupra microorganismelor şi răspunsul lor la diferiţii factori de mediu.

Urmează apoi cinci capitole în care se discută activitatea metabolică a microorganismelor. În această parte a cărţii, după o scurtă privire de ansamblu asupra metabolismului micro-

bian şi o prezentare a fenomenelor de pătrundere şi transport al substanţelor în celulă, sînt tratate, în capitole speciale, procesele biochimice producătoare şi consumatoare de energie, precum şi mecanismele de reglare a acestora, inclusiv controlul lor genetic.

Se discută apoi, în capitolul al nouălea, aspectele biochimice legate de creşterea, dezvoltarea şi supravieţuirea microorganismelor, pentru ca în ultimul capitol să se arate procesele de diferenţiere, respectiv procesele morfogenetice din celulele vegetative, producerea şi germinarea sporilor.

Toate capitolele cărţii sînt amplu ilustrate cu fotografii, grafice, formule chimice şi scheme metabolice ; fiecare capitol cuprinde indicaţii bibliografice, iar cartea este însoţită de o listă a prescurtărilor şi simbolurilor utilizate, precum şi de un amplu index.

Remarcăm în mod deosebit faptul că, foarte adesea, pe parcursul diferitelor capitole, autorul nu se mulţumeşte numai cu prezentarea datelor şi rezultatelor acumulate în domeniul microbiologiei chimice, ci se referă totodată şi la aspectele metodologice generale, la căile şi mijloacele de cercetare a diferitelor procese biochimice prezentate.

Prin amplul material documentar şi bibliografic inserat, cartea constituie un ghid preţios pentru toţi acei specialişti care posedă cunoştinţe de bază în domeniul microbiologiei şi biochimiei şi doresc să facă legătura între aceste două discipline ale ştiinţelor biologice.

S. Vasu
Institutul de biochimie
al
Academiei Republicii Socialiste România

F. HAUROWITZ, *Immunochemistry and the biosynthesis of antibodies* (*Imunochimie şi biosinteza anticorpilor*), Interscience, New York — Londra — Sydney, 1968, 301 p.

Dacă cercetările moderne de imunologie au fost satisfăcător redate în cîteva tratate recente, consacrate acestei discipline (vezi, de exemplu, cărţile lui Humphrey, Boyd şi Gray), problematica imunochimică n-a fost cuprinsă complet în nici o carte apărută în ultimii 30 de ani. Imunochimia a exercitat o atracţie deosebită asupra cercetătorilor mai mult ca o disciplină experimentală cu numeroase aplicaţii în domenii largi ale biologiei decît ca o disciplină de sine stătătoare, care îşi are propriile sale obiective de atins. De aceea, cartea prof. Haurowitz, pe lîngă valoarea ei intrinsecă, monografică, are meritul de a face o primă sinteză a întregului material experimental şi teoretic pe care se bazează imunochimia modernă.

Prin structura ei, cartea delimitează imunochimia de alte discipline înrudite, ca imunogenetica şi imunopatologia. Principalele preocupări ale imunochimiei se referă la : specificitatea şi imunogenicitatea antigenelor (cap. 2), structura anticorpilor şi imunoglobulinelor (cap. 5), interacţiunea antigen-anticorp (cap. 6), soarta metabolică a antigenelor injectate (cap. 8), producerea anticorpilor în sisteme biologice (cap. 9), formarea anticorpilor *in vivo*, răspunsul primar şi secundar (cap. 10), mecanismul formării anticorpilor (cap. 12).

Deoarece cartea a fost concepută pe baza unui curs de imunochimie ţinut studenţilor, ea cuprinde şi acele elemente de imunologie care permit cititorului să înţeleagă nemijlocit unele probleme care ţin de genetică sau de patologie. De aceea, în carte pot fi găsite numeroase pagini dedicate toleranţei imunologice şi determinismului ei genetic, hipersensibilităţii şi implicaţiilor sale în patologie, precum şi chimiei şi biologiei complementului.

În sfîrşit, merită menţionat că autorul n-a rezistat tentaţiei de a prezenta şi unele aspecte ale imunochimiei experimentale, sub forma a două capitole dedicate detectării, determinării cantitative, izolării şi purificării anticorpilor (cap. 3 şi 4). Aspectele metodologice sînt de altfel amintite pe tot parcursul lucrării şi bibliografia abundentă (peste 1000 de indicaţii) suplineşte laconismul autorului asupra unor chestiuni de imunochimie analitică.

Jumătate din carte este dedicată biosintezei anticorpilor şi acelor probleme care stau la baza înţelegerii acestui fenomen. Această disproporţie, reflectată de altfel şi în titlul oarecum neaşteptat al cărţii (biosinteza anticorpilor fiind de fapt un obiect de studiu al imunochimiei), este explicabilă dacă se are în vedere faptul că prof. Haurowitz a adus în această problemă nu numai fapte experimentale cruciale, dar şi contribuţii teoretice care au impus un anumit fel de a raţiona la interpretarea fenomenelor (teoria instrucţionistă asupra formării anticorpilor). Peste 20 de lucrări ale autorului şi ale colaboratorilor săi, apărute între 1932 şi 1966 !, stau la baza conceptelor asupra persistenţei antigenelor în celule şi asupra mecanismului de formare a anticorpilor. Evoluţia teoriilor asupra formării anticorpilor cuprinde şi o încercare recentă (1965) a prof. Haurowitz de a reconcilia concepţia sa mai veche asupra însuşirii de matriţă a antigenelor cu punctele de vedere moderne asupra rolului acizilor nucleici în biosinteza anticorpilor. Autorul tratează la acest punct, cu deplină obiectivitate, problemele majore, nesoluţionate ale imunochimiei, cu privire la : eterogenitatea anticorpilor, polimorfismul genetic al imunoglobulinelor, problema uni- şi pluripotenţialităţii celulelor formatoare de anticorpi, diferenţele genetice în răspunsul imun. Eterogenitatea zonelor de combinare a anticorpilor, suprapusă peste eterogenitatea (variabilitatea) imunoglobulinelor, sugerează autorului ideea pluripotenţialităţii celulelor formatoare de anticorpi înainte de contactul cu antigenul. Numai contactul cu antigenul ,,prelucrat'' are capacitatea de a derepresa capacitatea de formare a anticorpilor omologi (Szilard) şi, astfel, de a converti o celulă nefuncţională, pluripotenţială, într-una activă, dar unipotenţială.

Intercalarea ipotezelor şi teoriilor noi printre ,,adevărurile'' vechi pe care se bazează imunochimia, pe lîngă că ridică valoarea cărţii, o face interesantă şi pentru specialişti. În acest context poate fi considerată ca reuşită tentativa autorului de a contopi cunoştinţele ,,clasice'' asupra antigenicităţii, interacţiunii antigen-anticorp-complement şi biosintezei anticorpilor, cu cele obţinute în ultimul deceniu.

Victor Gheţie
Institutul de biochimie
al
Academiei Republicii Socialiste România

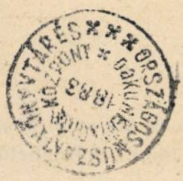
Regulation of the antibody response (*Reglarea formării anticorpilor*), sub red. B. CINADER, Ch. C. Thomas Publ., Springfield, Illinois, 1968, 400 p.

Reglarea răspunsului imun manifestat prin producerea de anticorpi se realizează printr-o multitudine de căi, prin intermediul unor mecanisme imunologice (toleranţă, interacţiune între celule), biochimice (inhibiţie de tip *feed-back* prin anticorpi, control prin acizi nucleici) şi genetice (incapacitate înnăscută de a sintetiza anticorpi faţă de anumiţi determinanţi, specificitatea alotipică).

Prezentarea fiecărui aspect al acestei probleme a fost încredințată unui cercetător consacrat, cu o îndelungată și fructuoasă activitate în domeniul pe care îl tratează. De aceea, lucrările sînt axate de cele mai multe ori pe discutarea rezultatelor proprii și pe compararea lor cu cele ale altor autori. Din acest motiv, lucrările pot fi asimilate numai de un cititor avertizat, care posedă cunoștințe întinse de imunochimie și imunogenetică. Tot din această cauză, cartea nu dă o imagine de ansamblu a problemei înscrise în fruntea ei, ci una fărîmițată în numeroase elemente din care cititorul urmează să-și facă o sinteză personală.

Din conținutul cărții, alcătuită din 17 capitole și semnată de nu mai puțin de 29 de autori, am reținuturmătoarele titluri : cap. 1: Imunogenicitatea și toleranța față de macromoleculele autologe (B. Cinader), cap. 4 : Studii asupra antigenicității cu antigene artificiale (B. Benacerraf), cap. 6 : Inhibarea formării anticorpilor prin anticorpi serici (J.W. Uhr), cap. 8 : Mecanisme homeostatice în sinteza anticorpilor celulari și în reacții imune mediate prin celule (E. Möller, S. Britton, G. Möller), cap. 10 : Alotipuri și anticorpi (P.G.H. Gell), cap. 12 : Rolul reglator al timusului (D. Osoba), cap. 15 : Controlul genetic al imunoglobulinei de șoarece (L.A. Herzenberg, N.L. Werner), cap. 16 : Asupra rolului acizilor nucleici în formarea anticorpilor (W. Braun, E. P. Cohen).

Victor Gheție
Institutul de biochimie
al
Academiei Republicii Socialiste România



SIMPOZIONUL ROMÂNO-SUEDEZ DE „SEPARARE ȘI ANALIZĂ BIOCHIMICĂ"

În zilele de 1 și 2 aprilie a avut loc la București o manifestare științifică comună româno-suedeză dedicată metodelor moderne de analiză biochimică.

Lucrările s-au desfășurat în aula Academiei, în prezența unui public numeros, alcătuit în majoritate din oameni de specialitate din București, după următorul program :

Marți 1 aprilie, orele 9—13

Prof. dr. E. Macovschi : Cuvînt introductiv.
Prof. dr. A. Tiselius : Separarea biochimică. Unele aspecte generale.
Prof. dr. J. Porath : Adsorbenți noi cu aplicare în biochimie.
Dr. H. D. Schell : Derivați noi de sinteză ai agarozei cu aplicare în cromatografie și gel-filtrare.
Dr. V. Gheție : Electroforeza și imunoelectroforeza proteinelor în geluri schimbătoare de ioni.
Prof. dr. E. Soru : Purificarea enzimelor prin cromatografie pe o singură coloană constituită *in tandem* din mai multe faze de structură diferită.
Dr. L. G. Allgen : Folosirea în clinică a metodelor analitice de biochimie.
Prof. dr. L. M. Buruiană : Separarea izoenzimelor cu ajutorul gel-filtrării.
Dr. L. G. Allgen : Analize enzimatice în medicină.

Miercuri 2 aprilie, orele 9—14

Prof. dr. J. Sjoquist : Importanța biologică a regiunii Fc a imunoglobulinelor.
Geiza Szegli : Principiile fizico-chimice și imunochimice care stau la baza izolării imunoglobulinelor la nivel de laborator și posibilitatea transpunerii lor pe scară industrială.
Dr. O. Vesterberg : Focalizarea izoelectrică, o metodă pentru separarea, purificarea și caracterizarea proteinelor.
Dr. D. Tănăsescu : Separarea proteinelor prin electroforeză în gel de poliacrilamidă.
Dr. O. Vesterberg : Studii asupra proteinelor din microorganisme prin focalizare izoelectrică.
Dr. M. Șerban : Histocromatografia în strat subțire și aplicațiile ei în biochimie.
Ing. R. Thunberg : Gel-filtrarea în strat subțire.
S.S. Vasu : Electroforeza acizilor nucleici fracționați prin cromatografie pe schimbători de ioni și gel-filtrare.

Dr. I. Wadso: Microcalorimetria de curgere ca mijloc analitic în biochimie și domeniile înrudite.

Dr. O. Horer: Studiul biopolimerilor cu ajutorul spectrofotometriei în medii foarte tulburi.

În după-mesele zilelor de 1 — 2 aprilie au avut loc demonstrații în cadrul expoziției suedeze de aparatură științifică, în care au fost prezentate unele noutăți: instalația pentru focalizarea izoelectrică, aparat pentru distribuția în contracurent în strat subțire, utilizînd sisteme bifazice de polimeri, aparat pentru microelectroforeză liberă (analitică și preparativă). Tot după-masa au fost organizate mese rotunde avînd ca temă: Gel-filtrarea (condusă de prof. J. Porath), Electroforeza și focalizarea izoelectrică (dr. O. Vesterberg), Imunoglobulinele (prof. J. Sjoquist și dr. V. Gheție), Calorimetria în biochimie (dr. I. Wadso).

Simpozionul a decurs într-o atmosferă de lucru, referatele-comunicări stîrnind discuții și comentarii care s-au prelungit pînă în cadrul meselor rotunde.

Comunicatorii suedezi au abordat acele aspecte ale analizei biochimice în care contribuția lor a fost consistentă, deschizătoare de noi drumuri experimentale: electroforeza (prof. A. Tiselius), gel-filtrarea (prof. J. Porath), focalizarea izoelectrică (dr. O. Vesterberg), separarea prin sisteme bifazice de polimeri. Această ultimă lucrare a prof. P. - A. Albertsson a fost comunicată la simpozion de dr. Ericsson.

Cercetătorii români s-au încadrat toți în tematica simpozionului, unii dintre ei prezentînd contribuții metodologice originale: electroforeza și cromatografia în geluri de agaroză schimbătoare de ioni (dr. V. Gheție și dr. H. Schell), spectrofotometria în medii foarte tulburi ca metodă de caracterizare a acizilor nucleici și proteinelor (dr. O. Horer), histocromatografia ca metodă de analiză a lipidelor celulare (dr. M. Șerban), cromatografia în straturi multiple (prof. E. Soru).

Acest prim contact dintre biochimiștii celor două țări a constituit un excelent prilej de prezentare și confruntare critică a realizărilor obținute de ambele părți și a fost fructuos atît pentru români, cît și pentru suedezi.

„Studii şi cercetări de biochimie" publică articole originale, de nivel ştiinţific superior, din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici, ca: Viaţa ştiinţifică, în care prin scurte note, sînt aduse la cunoştinţa cititorilor unele manifestări din domeniul biochimiei: congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experienţă între cercetătorii români şi cei străini etc. Recenzii — în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în ţară şi peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugaţi să înainteze articolele, notele şi recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuş, pe hîrtie de calc. Tabelele şi ilustraţiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planşe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea aceloraşi date în text, tabele şi grafice. Explicaţia figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de iniţiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanţelor internaţionale.

Autorii au dreptul la un număr de 50 de extrase, gratuit.

Responsabilitatea asupra conţinutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondenţa privind manuscrisele, schimbul de publicaţii etc., se va trimite pe adresa Comitetului de redacţie: str. Docenţilor nr. 20, Bucureşti 63, Sectorul I.

1969 OKT 1 1

LUCRĂRI APĂRUTE IN EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

R. PORTOCALĂ şi L. POPA, **Acizii ribonucleici celulari şi virali**, 1966, 25 × 17,50, 375 p., 8 pl., legat, anvelopă, 26 lei.

M. G. BALŞ, **Imunofluorescenţa şi aplicaţiile ei în inframicrobiologie**, 1966, 25 × 17,50, 285 p., 18 pl., legat, anvelopă 27 lei.

ION CANTACUZINO, **Opere alese**, Œuvres choisies, 1965, 25 × 17,50, 687 p., legat, anvelopă, 44 lei.

* * * Omagiu acad. prof. RALUCA RIPAN, 1966, 30,50 × 21,50, 628 p. + 2 pl., legat, anvelopă, 50 lei.

La revue „Studii şi cercetări de biochimie" paraît 4 fois par an. Le prix d'un abonnement annuel est de $ 5 — FF. 25 — DM. 20 — Toute commande à l'étranger sera adressée à CARTIMEX, Boîte postale 134 — 135 Bucarest, Roumanie ou à ses représentants à l'étranger.

ST. CERC. BIOCHIM., TOMUL 12, NR. 3, P. 205 — 300, BUCUREŞTI, SEPTEMBRIE, 1969

I. P. Inf. — c. 3552

43816

Lei 20.

F 1330 04

studii şi cercetări de biochimie

4

TOMUL 12
1969

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

St. cerc. biochim., tomul 12, nr. 4, p. 301—408, Bucureşti, decembrie, 1969

COMITETUL DE REDACȚIE

Redactor responsabil:

ACADEMICIAN E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUȘANSCHI

Membri:

S. OERIU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; M. MEZINCESCU; I. VASILESCU; TR. RĂDULESCU; VICTORIA ALEXANDRESCU.

Secretar de redacție:

VICTOR GHEȚIE

Revista apare de 4 ori pe an.

Prețul unui abonament anual este de 80 lei.

În țară abonamentele se fac la oficiile poștale, agențiile poștale, factorii poștali și difuzorii voluntare din întreprinderi și instituții.

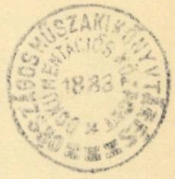
Orice comandă din străinătate (numere izolate sau abonamente) se fac prin CARTIMEX, Căsuța poștală 134—135, București, Republica Socialistă România, sau prin reprezentanții săi din străinătate.

Manuscrisele, cărțile și revistele pentru schimb, precum și orice corespondență se vor trimite pe adresa comitetului de redacție al revistei „Studii și cercetări de biochimie".

ADRESA REDACȚIEI:
București, str. Docenților nr. 20
Sectorul 1

E 1330

ACADEMIA REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA



STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE

Tom. 12, nr. 4 1969

SUMAR

Pag.

S. OERIU, A. POPA, C. HULUŢĂ, F. FIDANOF, Cercetări privind acţiunea folcisteinei Oeriu „P" la *Populus* × *Euramericana* (Dode) *Guinier CV' Robusta* 305

V. ALEXANDRESCU, F. MIHĂILESCU, Studiul electroforetic al amilazelor porumbului în primele etape de creştere 315

I. BRAD, GH. OLTEANU, Z. MARCU, Metodă cronometrică de determinare a activităţii peroxidazei 323

L. BUZILĂ, Modificări moleculare ale vicilinei rămase nehidrolizată în cursul germinaţiei seminţelor de mazăre *(Pisum sativum)* 327

M. FURNICĂ, P. GEORGESCU, G. BOTEZ, Caracterizarea spectrofotometrică a ADN după iradiere *in vivo* VI. Unele proprietăţi fizico-chimice ale ADN nou sintetizat în ficatul în regenerare al şobolanilor iradiaţi 333

I. HIRSCHFELD, I. KREPSZ, M. FĂGĂRĂŞAN, Transportul metioninei marcate cu ^{75}Se-selenometionină în celulele tumorale ascitice Ehrlich iradiate cu raze X 341

E. ILIESCU, Unele aspecte biochimice ale procesului de diferenţiere a mugurilor florali la cais 345

C. IORDACHE, Cromatografia proteinelor sarcoplasmatice şi localizarea ribonucleazelor din muşchiul sartorius de broască 355

V. KOVÁCS, Aspecte ale metabolismului metioninei ^{35}S şi selenometioninei ^{75}Se la şobolani 367

I. I. NIŢESCU, A. CONSTANTINESCU, M. MIHĂIŢĂ, Elemente distinctive ale electroforegramei proteinelor serice în erizipel . . . 373

D. POPOV, Fosfataza acidă şi fosforul anorganic din porumb în primele etape de creştere 377

F. ZETEA, C. BODEA, Conţinutul în aminoacizi liberi (AAL) şi aminoacizi proteici (AAP) al unor hibrizi de porumb în comparaţie cu genitorii lor 387

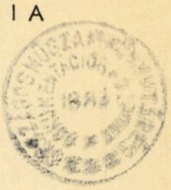
NOTĂ DE LABORATOR

S. VASU, Dispozitiv pentru turnarea plăcilor de poliacrilamidă utilizate în electroforeza acizilor nucleici şi a proteinelor 393

VIAŢA ŞTIINŢIFICĂ 397

RECENZII 401

ACADEMIA REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA



STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE

Tom. 12, nr. 4 1969

CONTENTS

Page

S. OERIU, A. POPA, C. HULUŢĂ, F. FIDANOF, Studies on the effect of Oeriu "P" folcysteine on Populus x Euramericana (Dode) Guinier CV' Robusta 305

V. ALEXANDRESCU, F. MIHĂILESCU, The electrophoretic study of maize amylases during the first growing stages 315

I. BRAD, GH. OLTEANU, Z. MARCU, Chronometrical method for determination of peroxidase activity 323

I. BUZILĂ, Molecular modifications of the vicillin undigested during pea seeds (Pisum sativum) germination 327

M. FURNICĂ, P. GEORGESCU, G. BOTEZ, Spectrophotemetrical characterization of DNA after irradiation in vivo. VI. Some new physicochemical properties of DNA newly synthetised in regenerating liver of irradiated rats 333

I. HIRSCHFELD, I. KREPSZ, M. FĂGĂRĂŞAN, The transfer of ^{75}Se-labelled methionine in X-ray irradiated Ehrlich ascites carcinoma cells 341

E. ILIESCU, Some biochemical aspects of the differentiation of apricot floral buds 345

C. IORDACHE, Chromatography of sarcoplasmatic proteins and localization of ribonucleases from sartorius muscle of frog. 355

V. KOVÁCS, Some aspects of ^{35}S-methionine and ^{75}Se-selenomethionine metabolism in rats 367

I. I. NIŢESCU, A. CONSTANTINESCU, M. MIHĂIŢĂ, Characteristics of serum protein electropherograms in erysipelas. 373

D. POPOV, The acid phosphatase and the inorganic phosphorus of maize in the first growth phases 377

F. ZETEA, C. BODEA, The free (FAA) and protein aminoacid (PAA) content of some maize hybrids as compared to their genitors. . . 387

LABORATORY NOTE

S. VASU, Device for pouring polyacrylamide plates used in nucleic acid and protein electrophoresis 393

MEETINGS 397

BOOK REVIEW 401

St. cerc. biochim., 12, 4, 305–314 (1969)

CERCETĂRI PRIVIND ACȚIUNEA FOLCISTEINEI OERIU „P" LA *POPULUS × EURAMERICANA (DODE) GUINIER CV' ROBUSTA**

S. OERIU, A. POPA, C. HULUȚĂ, F. FIDANOF

Rezumat. — Sub acțiunea tratamentului cu Folcisteină Oeriu „P", aplicată sub formă de aerosoli, la culturile de Populus × Euramericana CV' Robusta, s-a obținut o dezvoltare mai viguroasă a puieților, cu sporuri de creștere între 14–20%, o creștere a raportului SH/SS, care influențează modificări biochimice utile.

Pornind de la acțiunea grupărilor tiolice (SH) în procesele metabolice cu rol în creșterea și dezvoltarea organismelor vegetale [1], [3], [6], [10], ne-am propus studiul influenței Folcisteinei Oeriu „P" (FOP), eliberatoare în organism de grupări SH active, asupra puieților de *Populus × Euramericana (Dode) Guinier CV' Robusta.*

CERCETĂRI PRELIMINARE

În anul 1966 s-a administrat FOP la puieți și butași de *Populus × Euramericana CV' Robusta*, plantați pe sol brun roșcat de pădure la Stațiunea INCEF Snagov, constituindu-se 4 variante a cîte 25 exemplare.

Folcisteina a fost administrată la puieți în două etape în cursul sezonului de vegetație, prin pulverizare cu aparatul de produs aerosoli „Fontan", în concentrație de 1 : 100 000 (V_1) și 1 : 200.000 (V_2).

La variantele în care s-au experimentat butași, aceștia au fost menținuți înainte de plantare în soluție de FOP (conc. 1 : 100 000), timp de 6 ore (V_3) și 24 ore (V_4).

În cursul sezonului de vegetație, culturile au primit suplimentar apă, în special în perioadele secetoase.

Din analiza dezvoltării în înălțime a culturilor (fig. 1) reiese că cele mai bune rezultate s-au obținut la variantele în care administrarea FOP s-a făcut prin pulverizare. Varianta tratată cu conc. 1 : 100.000 (V_1) prezintă o creștere de 117% în raport cu martorul.

Variantele în care butașii au fost menținuți în soluție de FOP (V_3 și V_4) au valori inferioare martorului (85–95%).

Utilizînd fosforul marcat (P^{32}) ca indicator al condițiilor de dezvoltare a culturilor, s-a urmărit raportul dintre intensitatea absorbției de

* Comunicare făcută la Conferința națională de fiziologie animală și vegetală, București, 9–11 octombrie 1967.

P^{32} în lemn și frunze și eficacitatea administrării FOP [11]. Cea mai puternică absorbție a fosforului marcat are loc la varianta V_1 (conc. 1 : 100 000) (Fig. 2).

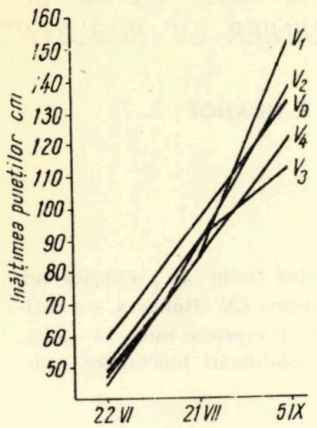


Fig. 1. — Creșterea în înălțime a puieților de *P. robusta* tratați cu FOP (*1966*) Administrarea FOP s-a efectuat la 22.VI și 21.VII. V_0 = martor; V_1 = puieți tratați cu FOP 1 : 100.000 prin pulverizare; V_2 = puieți tratați cu FOP 1 : 200.000 prin pulverizare; V_3 = butași menținuți în soluție de FOP, 6 ore; V_4 = butași menținuți în soluție de FOP, 24 ore.

Absorbția totală a fosforului marcat pe întregul puiet este prezentată în figura 3. Și aici V_1 prezintă cea mai puternică absorbție, iar V_3 (butași menținuți 6 ore în soluție de FOP) cea mai slabă.

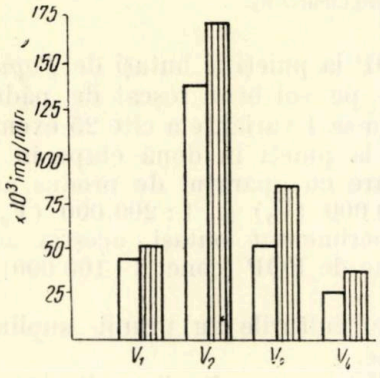


Fig. 2. — Absorbția P^{32} (imp./min.) în puieții de *P. robusta în frunze și lemn(1966)*
□ frunze
▨ lemn
V_1, V_2, V_3, V_4 = fig. 1

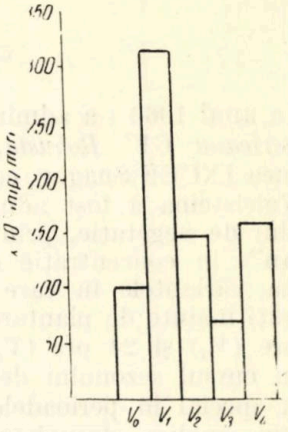


Fig. 3. — Absorbția totală de P^{32} (imp./min.) în puieți de *P. robusta* (1966) V_1, V_2, V_3, V_4 = = fig. 1

Rezultatele obținute în anul 1966 evidențiază că Folcisteina Oeriu „P" este un stimulator de creștere la puieții de *P. Robusta*; această acțiune se manifestă în special la concentrația 1 : 100.000, administrată prin pulverizare fină, în două etape.

Aceste rezultate stau la baza experiențelor întreprinse în continuare, în anul 1967.

LUCRĂRI EXECUTATE ÎN ANUL 1967

MATERIAL ȘI METODĂ

Pentru lucrările din acest an s-a instalat un bloc experimental cu 8 variante (a cîte 40 exemplare pe variantă) în cadrul Stațiunii INCEF Snagov, în care s-au constituit și variante irigate, de butași de *P. Robusta* — schema 25 × 100 cm. Irigarea s-a considerat necesară, deoarece pentru cultura plopilor euramericani solul brun roșcat de pădure este deficitar sub acest aspect.

Folcisteina a fost administrată într-o singură concentrație, și anume 1 : 100.000, prin pulverizare, în două etape, prima la 4. VII, iar a doua la 4. VIII.

Variantele studiate au fost următoarele : V_0 -martor ; V_0 FOP martor tratat cu FOP ; V_1 = irigat cu 120 l/m² ; V_1 FOP = irigat cu 120 l/m² și tratat cu FOP ; V_2 = irigat cu 180 l/m² ; V_2 FOP = irigat cu 180 l/m² și tratat cu FOP ; V_3 = irigat cu 240 l/m² ; V_3 FOP = irigat cu 240 l/m² și tratat cu FOP.

Administrarea suplimentară de apă prin irigare s-a efectuat din 10 în 10 zile, în cursul lunilor iulie și august. În intervalul dintre două irigări s-a determinat umiditatea solului pînă la adîncimea de 100 cm.

S-au studiat comparativ la variantele experimentale transpirația, coeficientul economic, asimilația clorofiliană, respirația [12] ; vitaminele B_1 și B_2 [2], [5] ; glutationul [13] ; fosfataza și apiraza [4]. Determinările s-au făcut pe probe medii de frunze, recoltate de la același nivel și în aceleași condiții.

S-a stabilit de asemenea suprafața foliară a puietului mediu din fiecare variantă și creșterea în înălțime a puieților.

REZULTATE

Creșterea și dezvoltarea. Creșterea în înălțime a puieților de *P. robusta* în urma administrării de FOP este reprezentată în figura 4.

Cu toate că la data administrării de FOP puieții din variantele experimentale aveau înălțimi apropiate, la sfîrșitul sezonului de vegetație apar diferențieri distincte în favoarea variantelor irigate, tratate cu FOP.

Sporurile de creștere în înălțime în urma aplicării de FOP sînt de 14—20%.

În legătură cu suprafața foliară (fig. 5), variantele irigate și tratate cu FOP prezintă cea mai mare dezvoltare, în comparație cu cele netratate. Suprafața foliară la varianta neirigată și tratată cu FOP este cea mai redusă. Cea mai mare dezvoltare a suprafeței foliare se constată la varianta V_3 la care suprafața foliară este aproape de două ori mai mare față de celelalte variante.

Intensitatea transpirației plantelor este în strînsă legătură cu cantitatea de apă din sol. Transpirația a fost determinată (după metoda Ivanov) la diferite nivele de umiditate a solului, în intervalul dintre două irigări.

Figura 6 reprezintă variația intensității transpirației la puieți, a doua zi după aplicarea șarjei de apă.

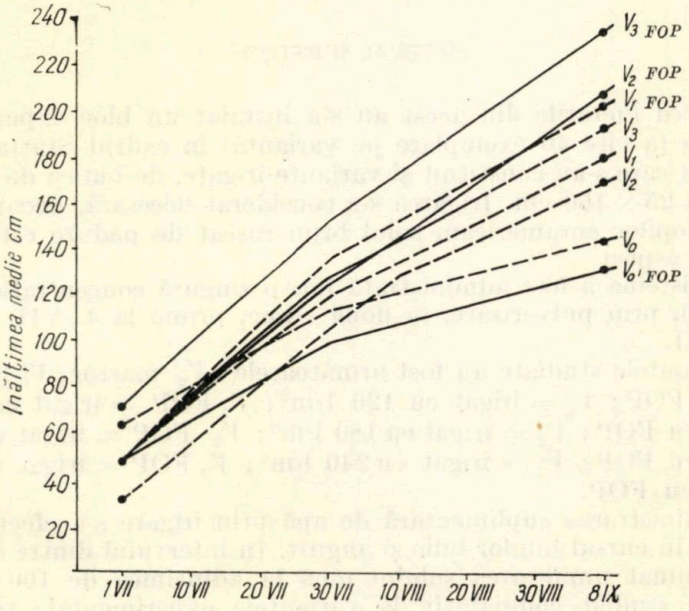


Fig. 4. — Înălțimea medie a puieților de *P. robusta*, în variante *irigate și tratate cu FOP*

——— variante tratate cu FOP

— — — variante netratate

Administrarea FOP la 4.VII și 4.VIII prin pulverizare: V_0 = martor neirigat, netratat; V_0 FOP = martor neirigat, tratat cu FOP; V_1 = irigat cu 120 l/mp; V_1 FOP = irigat cu 120 l/mp tratat cu FOP; V_2 = irigat cu 180 l/mp; V_2FOP = irigat cu 180 l/mp și tratat cu FOP; V_3 = irigat cu 240 l/mp; V_3 FOP = irigat cu 240 l/mp și tratat cu FOP.

Valoarea transpirației medii la varianta martor neirigată este de 480 mg/g/h, iar la variantele irigate de 1600—1700 mg/g/h. Variantele irigate transpiră mai intens decît variantele neirigate.

În figura 7 este redată variația intensității transpirației la mijlocul intervalului dintre două irigări.

Variantele (*B*), netratate cu FOP, manifestă o cădere a intensității transpirației la ora 16, în timp ce la variantele (*A*), tratate cu FOP, transpirația este încă activă la această oră. Transpirația medie la variantele irigate, netratate, este cuprinsă între 1120—1140 mg/g/h, iar la variantele irigate și tratate ea este de 1230—1420 mg/g/h.

În cadrul variantelor neirigate se înregistrează o creștere a intensității transpirației, ca urmare a ploilor ce au căzut înainte de executarea măsură-

torilor. Valoarea intensității transpirației medii este egală, neînregistrîndu-se o influență a tratamentului cu FOP, în condiții de neirigare.

Variația intensității transpirației la sfîrșitul intervalului dintre două irigări este prezentată în figura 8. Variantele netratate prezintă o scădere

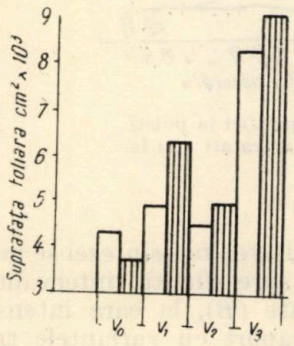


Fig. 5. — Suprafața foliară medie/puiet la *P. robusta* tratate cu FOP
netratate
V_1, V_2, V_3, V_4 = fig. 1

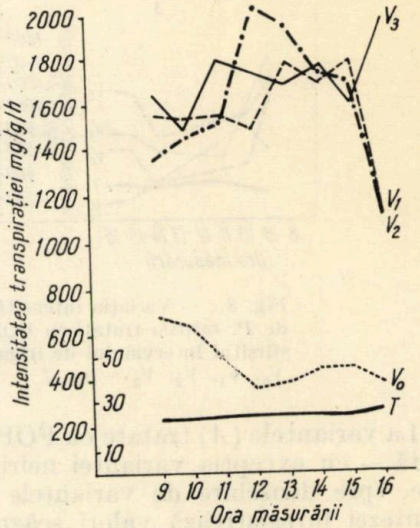


Fig. 6. — Variația intensității transpirației la puieți de *P. robusta* a doua zi după irigare
V_0, V_1, V_2, V_3 = fig. 1

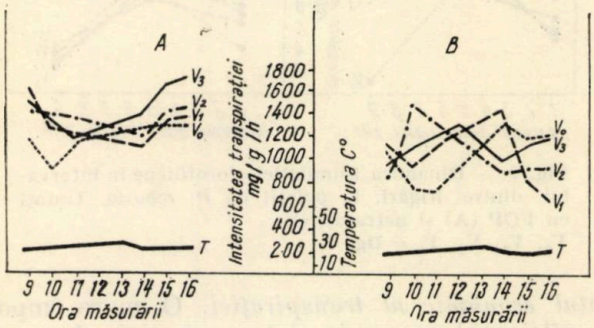


Fig. 7. — Variația intensității de transpirație la puieții de *P. robusta* tratați cu FOP(A) și netratați (B) la mijlocul intervalului de irigare.
V_0 = martor, neirigat; V_1 = irigat cu 120 l apă/mp; V_2 = irigat cu 180 l apă/mp; V_3 = irigat cu 240 l apă/mp.

accentuată a transpirației după ora 15, în timp ce la variantele tratate cu FOP transpirația este încă activă. La variantele neirigate, intensitatea transpirației medii la varianta cu FOP este inferioară variantei netratate.

Asimilația clorofiliană. Intensitatea fotosintezei prezintă modificări în intervalul dintre 2 irigări (fig. 9).

Cea mai intensă asimilație se înregistrează, la toate variantele, la mijlocul intervalului de irigare.

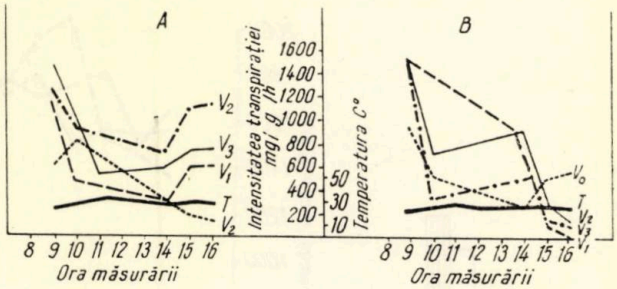


Fig. 8. — Variația intensității transpirației la puieți de *P. robusta* tratați cu FOP (A) și netratați (B) la sfîrșitul intervalului de irigare.
V_0, V_1, V_2, V_3 = fig. 7

La variantele (*A*) tratate cu FOP, intensitatea fotosintezei se menține ridicată — cu excepția variantei neirigate și spre sfîrșitul intervalului de irigare, spre deosebire de variantele netratate (*B*), la care intensitatea fotosintezei înregistrează valori scăzute în raport cu variantele tratate.

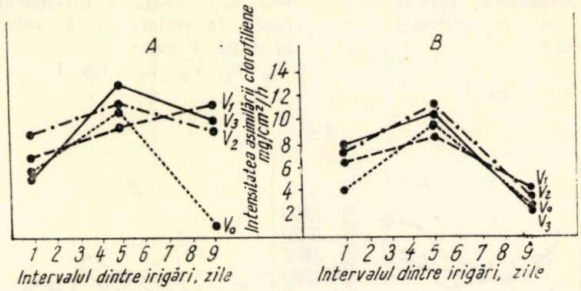


Fig. 9. — Dinamica asimilației clorofiliene în intervalul dintre irigări, la puieții de *P. robusta*, tratați cu FOP (A) și netratați (B).
V_0, V_1, V_2, V_3 = fig. 7

Coeficientul economic al transpirației. O mare importanță pentru practică are coeficientul economic al transpirației, el reprezentînd cantitatea de apă eliminată prin transpirație, necesară la sinteza de 1 g substanță uscată.

Figura 10 redă coeficientul economic al transpirației, determinat la mijlocul intervalului dintre irigări, atunci cînd activitatea fotosintezei este maximă. Cea mai mare valoare se înregistrează la variantele neirigate, netratate cu FOP. Dintre variantele irigate, mai economice sînt cele tratate cu FOP. Astfel la variantele cu cea mai intensă irigare, valoarea acestui coeficient este < 250 la variantele tratate cu FOP și < 300 la variantele netratate.

Respirația. Coeficientul economic al transpirației la variantele tratate cu FOP își găsește expresie în intensitatea scăzută a respirației la aceste variante. Respirația a fost determinată manometric, cu aparatul Warburg.

Figura 11 reprezintă intensitatea respirației.

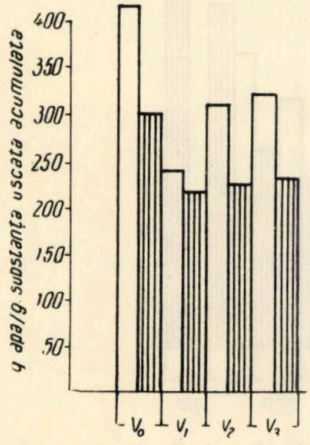


Fig. 10. — Coeficientul economic al transpirației în variantele tratate cu FOP, la mijlocul intervalului dintre irigări.
▥ tratat cu FOP
□ netratat
V_0, V_1, V_2, V_3 = fig. 7

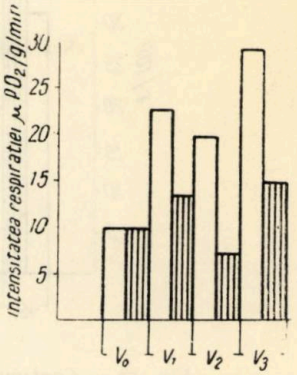


Fig. 11. — Intensitatea respirației la puieții de *P. robusta* în variantele tratate cu FOP
▥ tratat cu FOP
□ netratat
V_0, V_1, V_2, V_3 = fig. 7

La variantele irigate și tratate cu FOP, respirația este redusă, în medie la jumătate, în comparație cu variantele netratate. La variantele neirigate, nu se constată deosebiri în urma administrării de FOP.

Fosfataza și apiraza. Efortul redus în procesul respirației face să se înregistreze în frunze o activitate semnificativ crescută a apirazei $P < 0{,}02$, de la 1756 la 2022 mg%, care prin reducerea ATP în ADP pune în libertate cantități mari de energie. Se crează astfel condițiile unei biosinteze crescute, față de varianta martor netratată cu FOP, ceea ce și explică creșterea fosfatazei ($P = 0{,}05$) de la 451 mg% la varianta netratată la 536 mg% la varianta tratată cu FOP (tabela 1).

Tabela 1

Valorile medii în substanță uscată ale fosfatazei și apirazei din frunze

Varianta	Fosfataza u g%	Apiraza u g %
V_0	496	1.796
V_0 FOP	510	1.828
V_3	451	1.756
V_3 FOP	536	2.022

Conținutul în vitamine. La variantele irigate, tratate cu FOP, se observă o creștere a conținutului în vitaminele B_1 și B_2 (fig. 12).

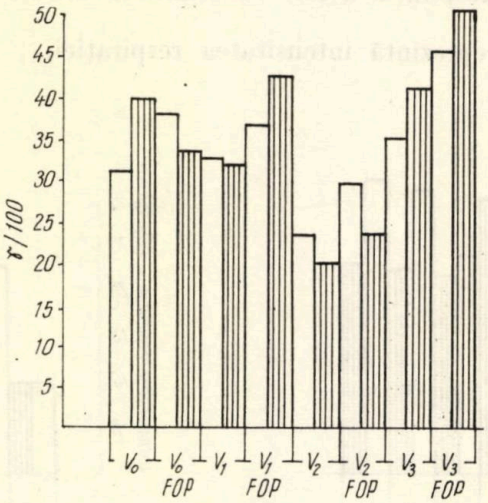


Fig. 12. — Conținutul în vitaminele B_1 și B_2 la puieții de *P. robusta* în variantele tratate cu FOP
□ Vit. B_1
▤ Vit. B_2
V_0, V_0 FOP, V_1, V_1 FOP, V_2, V_2 FOP, V_3, V_3FOP = fig. 4

Raportul SH/SS. Raportul SH/SS prezintă o creștere semnificativă ($P < 0{,}01$) la variantele V_2 (de la 3,05 la 5,53), V_3 (de la 6,04 la 6,92) și V_1 (de la 5,38 la 13,70).

Tabela 2

Valorile medii în substanță uscată ale grupărilor SH și SS (glutationul redus și oxidat) din frunze

Varianta	Glutation (mg %)			SH/SS
	redus	oxidat	total	
V_0	349	90	439	3,88
V_0FOP	360	79	439	4,56
V_1	383	71	454	5,38
V_1FOP	370	27	497	13,70
V_2	342	112	454	3,05
V_2FOP	376	68	444	5,53
V_3	381	63	444	6,04
V_3FOP	402	58	460	6,92

DISCUȚII

Observațiile fiziologice evidențiază o creștere accentuată a plantelor tratate, creștere ce-și găsește explicație prin mărirea semnificativă a raportului SH/SS, care influențează favorabil unele din mecanismele studiate, cum ar fi; asimilația clorofiliană, transpirația, respirația. Și este explicabil, pentru că grupările tiolice joacă un rol important în activitatea enzimatică, în sinteza și polimerizarea acizilor nucleici, în structura și în funcțiunea macromoleculelor proteice.

Modificările fiziologice și morfologice care apar sub acțiunea grupărilor SH au la bază stimularea proceselor metabolice cu rol de creștere și de dezvoltare a organismului vegetal, ceea ce duce la intensificarea fotosintezei la sfîrșitul intervalului dintre două irigări și la transpirația activă din timpul zilei, precum și la sporul de creștere în înălțime a puieților.

CONCLUZII

În condițiile experimentale stabilite s-a urmărit acțiunea Folcisteinei Oeriu „P" asupra culturilor de *Populus* × *Euramericana CV' robusta.*

Pulverizarea cu Folcisteină sub formă de aerosoli, în două etape, în conc. 1 : 100.000 duce la :

— dezvoltarea mai viguroasă a puieților, înregistrîndu-se sporuri de creștere între 14—20%;

— o creștere a intensității transpirației și a asimilației clorofiliene;

— modificări morfo-fiziologice, ca urmare a creșterii semnificative ($P < 0{,}01$) a raportului SH/SS însoțit de reglări biochimice utile, caracterizate printr-o activitate a respirației, corespunzătoare coeficientului economic al transpirației, o creștere favorabilă a activității apirazei și fosfatazei și o acumulare în vitaminele B_1 și B_2.

Institutul de cercetări forestiere și Colectivul de chimioterapie al Academiei Republicii Socialiste România

Prezentat la redacție la 12 decembrie 1967

BIBLIOGRAFIE

1. Bordeianu T., Oeriu S., Modoran I., Studii și Cercet. de Biol. Seria Botanică, **19**, 517—525 (1967).
2. Davidescu D., Ionescu M., Ivănescu M., Pavlovschi Gh., Sluşanschi H., *Metode de analize chimice și fizice folosite în agricultură*, Ed. Acad. R.P.R., 102—119, 1963.
3. Davidescu D., Oeriu S., Conf. Naț. de Fiziol. Anim. și Veget. 9—11 oct. 1967, Rezumate 22, p. 20.
4. Kotelnikova A. V., Dokladî Akad. Nauk SSSR, **78**, 945 (1951).
5. Lecoque R., *Les Vitamines*, G. Doin Paris, 1959, p. 99.

6. Oeriu I. şi Oeriu S., V-th Int. Congress of Chemotherapie Vienna, iun.-iul. 1967, Abstracts p. 77.
7. Oeriu S., *Advances in Gerontological Research*, Vol. I, p. 23—85, 1964.
8. Oeriu S., St. Cerc. Biol., **6**, 525—527, (1967).
9. Oeriu S., Alexandrescu N., Dronca I., Niculescu N., Mărculescu M., Bleotu GH., Oeriu I., Conf. Naţ. de Fiziol. Anim. şi Veget., 9—11 oct. 1967, Rezumate 68, p. 60.
10. Oeriu S., Vineş Gh., Oeriu I., Conf. Naţ. de Fiziol. Anim. şi Veget., 9—11 oct. 1967, Rezumate 77, p. 66.
11. Popa A., Ivanschi T., Bîrlănescu E., Constantinescu V., Stabilirea cu ajutorul izotopilor radioactivi a eficacităţii îngrăşămintelor minerale, aplicate la salcîm pe nisipuri, Rev. Pădurilor, *4*, p. 181—184 (1964).
12. Umbreith W. A. — Buries — Stanfel — Tissue Metabolism Manometric Methods, Burgess, Publ. Minneopolis, p. 59, 1965.
13. Woodford G. F. and Fry N. S., J. Biol. Chem., **37**, 465, (1932).

STUDIES ON THE EFFECT OF OERIU „P" FOLCYSTEINE ON POPULUS × EURAMERICANA (DODE) GUINIER CV' ROBUSTA

SUMMARY

Under Oeriu „P" Folcysteine treatment, administered by way of aerosols, cultures of Populus × Euramericana CV' Robusta were found to develop stronger seedlings with a 14 to 20 per cent increase in growth rates and a rise in the SH/SS ratio promoting useful biochemical changes.

St. cerc. biochim., 12, 4, 315–321 (1969)

STUDIUL ELECTROFORETIC AL AMILAZELOR PORUMBULUI ÎN PRIMELE ETAPE DE CREŞTERE

VICTORIA ALEXANDRESCU şi FLORIN MIHĂILESCU

Rezumat. — S-au cercetat amilazele din formaţiunile seminţei în repaus, germinate şi din frunze. Electroforeza s-a efectuat în gel de agar cu adaus de amidon. S-a stabilit că toate formaţiunile seminţei de porumb în repaus, precum şi frunza conţin 2—5 fracţiuni de tip α-amilazic; germinarea duce la mărirea mobilităţii unor fracţiuni şi la creşterea activităţii în scutel şi endosperm. β-amilaza se găseşte sub forma unei singure fracţiuni cu aceeaşi mobilitate electroforetică în toate cazurile. Frunza conţine o fracţiune de tip α-amilazic a cărei mobilitate electroforetică se modifică în funcţie de vîrstă şi după cum este evidenţiată în extract sau în suc vacuolar. Tulpiniţa şi frunza conţin aceleaşi forme moleculare ale α- şi β-amilazei, deci fotosinteza nu influenţează spectrul acestor enzime.

Amilazele din porumb (*Zea mays*) au fost cercetate de M. I. Smirnova Ikonnikova şi colab. [1], care afirmă că în seminţe proteinele active sînt concentrate în embrion, pe cînd endospermul conţine enzime în stare inactivă. L. S. Dure [2] arată că în seminţele de porumb în repaus există o activitate α-amilazică foarte mică, nemăsurabilă, care devine dominantă după 10 zile de la începutul germinării, pe cînd activitatea β-amilazei existente în sămînţă creşte lent, iar în a 10-a zi este mult depăşită de aceea a α-amilazei. I. A. Evniţkaia şi colab. [3] au arătat prezenţa ambelor amilaze în seminţele de porumb de diferite soiuri şi hibrizi şi au constatat variaţii importante (de 7 ori) pentru α-amilază, în funcţie de soi. V. Alexandrescu [4], [5], cercetînd polimorfismul amilazelor prin electroforeză pe hîrtie, a arătat că activitatea amilazică a axului embrionar al seminţei se repartizează în două fracţiuni, pe cînd cea a endospermului luat împreună cu scutelul, în trei fracţiuni. În timpul germinării, activitatea amilazică a axului embrionar se găseşte repartizată tot pe două fracţiuni, din care una prezintă o mobilitate electroforetică crescută; cea din endospermul luat împreună cu scutelul este localizată pe trei fracţiuni, cu aceleaşi mobilităţi electroforetice ca înainte de germinare, dar cu o activitate mult crescută. D. Schwartz [6], cercetînd separarea electroforetică pe gel de amidon a amilazelor din endospermul de porumb, a identificat o bandă pentru β-amilază. J. Scandalios [7], studiind prin electroforeza în gel de amidon amilazele din seminţele de porumb, ajunge la concluzia că omogenatele de boabe de porumb în repaus sau preînmuiate nu conţin activitate amilazică şi că prima apariţie de amilază a fost detectată în plantule în a doua zi de germinare, sub forma a două fracţiuni α-amilazice. De aseme-

nea, autorul arată că nu a putut detecta o activitate amilazică în frunze şi alte organe ale porumbului. După cum reiese din lucrările menţionate, părerile sînt împărţite în ceea ce priveşte existenţa amilazelor în sămînţa, în repaus.

Am constatat oportună reluarea cercetărilor, pentru a stabili dacă există α- şi β-amilaze active în formaţiunile seminţei de porumb (ax embrionar, scutel, endosperm), dacă ele se găsesc ca enzime unitare sau sub forme moleculare multiple şi care este evoluţia lor în primele 9 zile de germinare, precum şi în primele frunze ale plantei.

MATERIAL ŞI METODĂ

S-a lucrat pe hibridul dublu de porumb 336, procurat de la I.C.C.P.T. — Fundulea. Formaţiunile seminţei s-au separat manual, după înmuierea lor prealabilă, timp de 3—4 ore, în apă. După uscare la temperatura camerei, endospermii s-au măcinat fin, iar făina s-a trecut printr-o sită de 0,4 mm. Scutelii şi acşii embrionari s-au mojarat.

Germinarea s-a făcut în cutii Petri, la întuneric, după dezinfectarea prealabilă a seminţelor cu o soluţie 3% de apă oxigenată, timp de 10 min, iar după 2, 4, 6 şi 9 zile s-au separat plantula (tulpiniţa plus radicula), scutelul şi endospermul, care s-au folosit imediat pentru extracţia proteinelor. În a 7-a zi s-au obţinut şi extracte separat, din tulpiniţă şi rădăcini.

Pentru frunze seminţele s-au semănat în cutii cu pămînt şi plantele s-au crescut la lumină artificială. După 11, 13, 15 şi 18 zile de la semănare (8, 10, 12, 15 zile de la răsărire) s-au recoltat frunzele plantelor de porumb şi s-au trecut printr-o moară de laborator.

S-au preparat extracte proteice brute, folosind ca extractant soluţia de NaCl $9^0/_{00}$ în următoarele proporţii : (ml extractant : g de material supus extracţiei) 2 : 1 pentru făina din endosperm în repaus sau 1,5 : 1 după germinare, 5 : 1 pentru scutelul în repaus sau după germinare, 10 : 1 pentru axul embrionar negerminat sau 1 : 1 după germinare şi 0,4 : 1 pentru frunze. S-a lucrat şi cu frunze etiolate. De asemenea, s-au făcut extracţii în raportul 2 : 1 din seminţe negerminate. Durata extracţiei a fost în toate cazurile de 1 oră la temperatura camerei, după care extractele s-au centrifugat la 4500 g, iar supernatantele s-au dializat pînă a doua zi, la rece, faţă de apă distilată neutralizată şi s-au liofilizat.

Sucul vacuolar din frunze intacte s-a obţinut prin presare la 150 atm cu o presă Hafico. După dializă faţă de apă distilată, la rece, pînă a doua zi, s-a liofilizat.

Electroforeza s-a efectuat în gel de agar 1,25% (Special Agar Noble-Difco), cu adaus de 0,5% amidon pentru electroforeză (Mann), pe plăci de sticlă de 15 × 3 cm, folosindu-se în cuvă tamponul acid succinic 0,013 M-hidroxid de sodiu 0,0224 M, cu adaos de fosfat disodic 0,0167 M, vol/vol, pH 8,4; pentru plăci s-a utilizat acelaşi tampon, diluat cu două părţi apă distilată. Startul s-a făcut la mijlocul plăcii. S-a lucrat la 190 V, 0,5 mA/cm, timpul de migrare fiind de 5 ore. Plăcile s-au incubat la 37—40°C, timp de 30—60 min, după caz, apoi s-au imersat cîteva secunde într-o soluţie de iod în iodură de potasiu (o modificare a tehnicii lui M. Miholjčić şi B. Večerek [8]).

Aprecierea prezenței α- sau β-amilazei pe enzimograme se face după colorația zonelor respective : incoloră pentru α-amilază și brună-roșcată pentru β-amilază, pe fondul albastru dat de amidonul din gelul de agar. O dificultate în aprecierea formelor moleculare ale α- și β-amilazei pe enzimograme o constituie cantitățile foarte diferite în care se găsesc aceste enzime, precum și fracțiunile α-amilazice ele însăși. Astfel, în multe cazuri observăm prezența unor benzi roz care la o incubare prelungită devin incolore ; mai mult, în cadrul zonei brune-roșcate a β-amilazei apare pînă a doua zi și o fracțiune incoloră. Această comportare este datorată desigur prezenței în aceeași regiune a ambelor amilaze, sistemul tampon folosit de noi nereușind să le separe net. Strădaniile noastre de a găsi un sistem tampon care să separe cele două amilaze nu ne-au dus la rezultate mai bune. Astfel, sistemul tampon fosfat disodic-fosfat monosodic pentru gelul de agar cu adaos de amidon dă rezultate asemănătoare cu ale noastre, pe cînd tamponul acid boric-borax, pentru același gel sau sistemele tampon discontinue Poulik [9] și Ashton-Braden [10] pentru gelul de amidon dau rezultate mai slabe.

În lucrarea de față vom înțelege prin α-amilază activitate de tip α-amilazic.

REZULTATE

După electroforeză extractele proteice din *axul embrionar* în repaus și după 2, 4, 6 și 9 zile de germinare arată patru benzi pentru α-amilază și o zonă de aproximativ 1—1,5 cm pentru β-amilază (fig. 1, I). În cazul proteinelor din axul embrionar în repaus, una dintre fracțiunile α-amilazice se situează spre anod, iar toate celelalte spre catod. În timpul germinării, mobilitatea electroforetică a primelor trei fracțiuni crește, observîndu-se uneori după 6 zile chiar două fracțiuni spre anod, a treia spre catod aproape de start și a patra rămîne lîngă banda cu activitate β-amilazică. Deci, o caracteristică a germinării o constituie faptul că plantula nu-și schimbă numărul fracțiunilor amilazice, dar unele fracțiuni își măresc mobilitatea. La enzimogramele incubate timp îndelungat se constată că jumătatea dinspre catod a benzii de β-amilază devine incoloră. În toate cazurile, această bandă este cu atît mai lată cu cît germinarea avansează. Această evoluție a culorilor ne arată că în regiunea respectivă există de fapt un amestec de β-amilază cu foarte puțină α-amilază.

În ziua a 7-a de germinare, tulpiniță și rădăcinile s-au analizat și separat. Am constatat că aceste două organe diferă din punct de vedere al fracțiunilor α-amilazice. Aspectul descris mai sus este dat de α-amilaza din rădăcini, pe cînd tulpiniță conține numai trei fracțiuni, și anume cea mai electronegativă și două benzi spre catod, care cuprind între ele zona β-amilazei (fig. 1, I, c, d).

Știind că în gelul de agar se manifestă un efect marcat de electroendosmoză, am făcut corecția necesară la enzimograme și am constatat că toate fracțiunile evidențiate în această lucrare sînt electronegative.

Extractele proteice din *scutelul* în repaus și după 2, 4, 6 și 9 zile de germinare arată, după electroforeză, prezența a două benzi roz sau incolore pentru α-amilază și o zonă de aproximativ 1—1,5 cm, de culoare brună-

roşcată, pentru β-amilază. În cazul proteinelor din scutelul seminţei în repaus, cele două fracţiuni α-amilazice migrează spre catod. Prin germinare numărul lor nu se schimbă, dar după 6 şi 9 zile una dintre fracţiuni migrează spre anod, indicînd o creştere a sarcinii electronegative globale (fig. 1. II). Enzimogramele obţinute cu preparate proteice din scutel, după 6 şi 9 zile de germinare, relevă, la o incubare prelungită, şi fracţiunea α-amilazică dinspre catod a zonei β-amilazice.

Enzimogramele obţinute cu preparatele proteice extrase din *endospermul* seminţei în repaus şi după 2, 4, 6 şi 9 zile de germinare sînt asemănătoare cu cele ale scutelului.

Prezenţa în sămînţă a acestor două enzime în stare activă, mai ales a α-amilazei, este negată de unii autori [1] [7]. Datele noastre sînt obţinute cu seminţe îmbibate cu apă timp de 4 ore, pentru a le putea separa formaţiunile. Pentru a exclude presupunerea că amilazele s-ar putea activa în această perioadă, în cazul că s-ar găsi sub forme inactive sau chiar s-ar sintetiza *de novo*, am analizat şi *făina totală de porumb*. Enzimograma pune în evidenţă două benzi incolore sau slab roz pentru α-amilază şi zona brună-roşcată a β-amilazei, spre catod. Acest aspect îl prezintă endospermul şi scutelul, a căror masă domină în sămînţă comparativ cu cea a axului embrionar. Liofilizatele din aceste trei formaţiuni ale seminţei prezintă o activitate α-amilazică asemănătoare, raportată la 1 mg extract proteic liofilizat.

Liofilizatul obţinut din plantulă este asemănător ca activitate celui obţinut din axul embrionar în repaus, pe cînd în scutel găsim o activitate amilolitică de aproximativ 100 ori mai mare decît cea din plantulă, iar în endosperm una de aproximativ 100—300 ori mai mare, pe măsura avansării germinării.

Extractele proteice din *frunzele* de porumb de 11, 13, 15 şi 18 zile de la semănare dau după electroforeză enzimograme care prezintă pentru α-amilază trei benzi incolore a căror intensitate scade de la anod spre catod (fig. 1, III). Banda a treia apare numai după o incubare prelungită. β-Amilaza se găseşte în cantitate mică comparativ cu α-amilaza şi se situează pe enzimogramă între fracţiunile a doua şi a treia ale α-amilazei. Tulpiniţa şi frunza prezintă enzimograme asemănătoare. În funcţie de vîrsta frunzei, se constată diferenţe în mobilitatea primei fracţiuni α-amilazice dinspre anod, şi anume ea scade pe măsură ce vîrsta frunzei creşte. De asemenea, frunza de 18 zile arată o mărire a activităţii fracţiunii mijlocii de α-amilază. Această comportare se observă atît la extractele nedializate cît şi la cele dializate şi apoi liofilizate. Extractul din frunze etiolate evidenţiază aceleaşi forme moleculare pentru α- şi β-amilază.

Sucul vacuolar al frunzelor prezintă acelaşi număr de fracţiuni ca şi extractul, cu deosebirea că mobilitatea primei fracţiuni α-amilazice dinspre anod este întotdeauna mai mică decît în cazul extractului corespunzător (fig. 1, III b). Sucul vacuolar din frunze de 18 zile evidenţiază o mărire şi mai accentuată a activităţii fracţiunii mijlocii de α-amilază (fig. 1, IV). Celelalte fracţiuni nu suferă această modificare a mobilităţii lor nici în funcţie de vîrsta frunzei, nici în funcţie de faptul dacă sînt evidenţiate din extract sau din sucul vacuolar.

DISCUȚII

Datele noastre arată prezența amilazelor α- și β- în toate formațiunile seminței în repaus, în frunze și creșterea activității lor de sute de ori după două zile de germinare. J. Scandalios [7] nu a putut evidenția activitatea amilazică mică a seminței, deoarece a lucrat prin electroforeză pe gel de amidon, iar în acest caz, unde substratul este în cantitate mare, era necesară o activitate enzimatică puternică, similară cu activitatea amilazică ce apare după două zile de germinare pentru hidroliza amidonului în regiunile respective. Această explicație este valabilă și în cazul frunzelor, la care activitatea α-amilazică, raportată la 1 mg extract proteic liofilizat, este doar de 5 ori mai mare decît cea a seminței.

α-Amilaza se găsește în porumb în toate formațiunile și organele cercetate, sub forma a 2—5 fracțiuni distincte, cu mobilități diferite. β-Amilaza se prezintă sub forma unei benzi late, deci moleculele respective ar fi foarte apropiate din punct de vedere al sarcinii electrice globale; de fapt, credem că există o singură formă moleculară, unitară, ca și în cazul grîului [11], dar în extractul proteic liofilizat pe care îl folosim pentru electroforeză β-amilaza fiind în cantitate cu mult mai mare decît α-amilaza, se răspîndește pe o zonă mai largă. Se explică astfel de ce soluțiile tampon folosite nu separă complet α- și β-amilaza și de ce obținem ca benzi roz unele fracțiuni α-amilazice care se găsesc în imediata vecinătate a β-amilazei.

Un aspect care merită să fie evidențiat este creșterea mobilității electroforetice spre anod a unor fracțiuni α-amilazice în timpul germinării. Aceasta arată că unele forme moleculare enzimatic active sînt mai electronegative în timpul germinării decît în perioada de latență. Deci, pentru α-amilaza din porumb, o caracteristică a organelor în plină activitate metabolică, față de perioada de latență, este prezența de forme moleculare puternic electronegative. Aceste molecule ar putea fi din punct de vedere al lanțului polipeptidic aceleași, dar în perioada de latență erau sub formă de complexe cu alte molecule sau ioni, de care să se disocieze în cursul germinării (de ex. Ca^{2+}) sau să se asocieze cu molecule sau ioni care să le modifice sarcina electrică globală. Nu este exclusă însă și ipoteza ca lanțul polipeptidic al acestor α-amilaze să cuprindă după germinare mai mulți aminoacizi electronegativi (acid aspartic, acid glutamic etc.) și deci să fie forme moleculare nou formate. Credem că aceste modificări rapide s-ar face mai ușor prin asocierea-disocierea unor alte molecule cu cele ale enzimei, decît prin biosinteză. Această problemă formează obiectul preocupărilor noastre viitoare.

Germinația determină și apariția sau intensificarea unei fracțiuni α-amilazice cu mobilitate electroforetică mică, fracțiune care la frunze ajunge să fie mai evidentă. Intensitatea ei variază foarte mult de la o extracție la alta, deși condițiile de lucru au fost riguros respectate.

Un alt aspect important este evidențierea unei forme moleculare α-amilazice a cărei mobilitate diferă după cum această formă este evidențiată în sucul vacuolar sau în extractul țesutului respectiv. Astfel, la frunză prima fracțiune dinspre anod prezintă o mobilitate electroforetică mai mare dacă este evidențiată în extract sau în suc; în plus, dializa și

liofilizarea extractului duc la mărirea mobilității acestei fracțiuni. Această comportare se menține chiar dacă preparatul a fost dializat sau dacă liofilizatul de suc a fost dizolvat în soluție de NaCl 9‰ și apoi supus electroforezei, pentru a vedea dacă ionii Cl^- se adsorb pe moleculele respective. Această fracțiune este diferită de celelalte în ceea ce privește comportamentul. Probabil că sînt două enzime : una ar fi α-amilaza (α-1, 4-glucan 4-glucanohidrolaza, E. C. 3.2.1.1) care atacă legăturile α-1,4-glucan, și a doua glucoamilaza (α-1,4-glucan glucohidrolaza, E.C. 3.2.1.3) care atacă legăturile α-1,4-glucan, dar de la capătul nereducător al moleculei de amidon sau dextranaza (α-1,6-glucan 6-glucanohidrolaza, E.C. 3.2.1.11) care atacă legăturile α-1,6-glucan. Una din explicațiile acestui comportament ar putea fi faptul că unele glucozidaze [12] au nevoie de ionii Ca^{2+} ; pierderea parțială și treptată a acestor ioni în cursul extracției și dializei ar determina mărirea sarcinii electronegative a moleculelor. Lucrările noastre viitoare au drept scop și clarificarea acestei probleme.

CONCLUZII

1. Enzimele de tip α-amilazic se găsesc în stare activă în toate formațiunile seminței de porumb, atît în repaus cît și după germinare, precum și în frunze, sub forma a 2—5 fracțiuni ; β-amilaza se găsește sub o singură formă moleculară, cu aceeași mobilitate electroforetică în toate cazurile.

2. Germinarea duce la apariția de forme moleculare puternic electronegative de tip α-amilazic, precum și la apariția sau intensificarea unei fracțiuni slab electronegative. Aceste modificări au loc în primele 4—6 zile de germinare.

3. Frunza conține o fracțiune de tip α-amilazic a cărei mobilitate electroforetică se modifică în funcție de vîrstă și după cum este evidențiată în extract sau în sucul vacuolar, sau după cum extractul a fost sau nu dializat și liofilizat ; acest comportament arată prezența pe enzimograme a două tipuri de α-glucanohidrolaze.

4. Enzimele de tip α-amilazic și β-amilaza sînt prezente sub aceleași forme moleculare în sucul vacuolar și în citoplasma frunzei.

5. Frunza conține aceleași forme moleculare ale α- și β-amilazei ca și tulpinița, deci fotosinteza nu influențează spectrul enzimelor de tip α-amilazic din frunze.

6. Se constată diferențe mari de la un preparat la altul în activitatea fracțiunii de tip α-amilazic slab electronegativă.

Prezentat la redacție la 1 iulie 1969

Institutul de biochimie al Academiei Republicii Socialiste România

BIBLIOGRAFIE

1. M. I. Smirnova-Ikonnikova, E. P. Veselova, DAN SSSR, **120**, 849 (1958).
2. L. S. Dure, Plant Physiol., **35**, 925 (1960).
3. I. A. Evnitkaia, I. A. Popadici, Z. F. Folunina, Prikl. Biokhim. i Mikrobiol., **2**, 335 (1966).

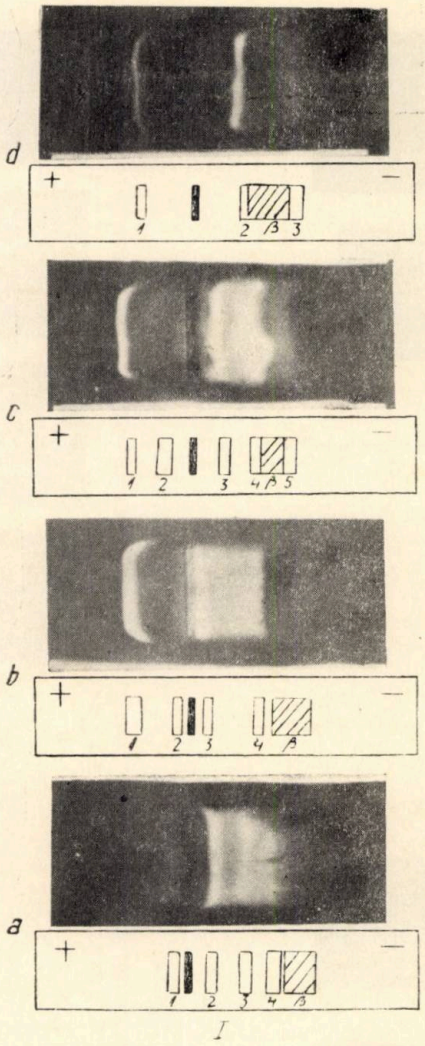
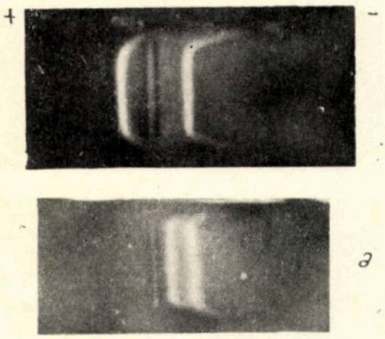


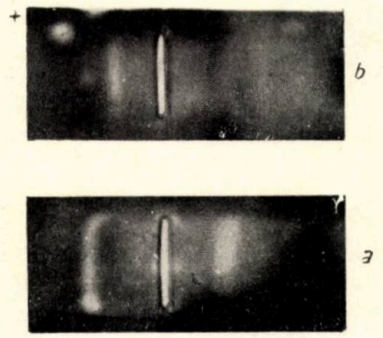
Fig. 1. — Enzimogramele preparatelor proteice din porumb:

I. *a* — Extract din axul embrionar negerminat;
b — După 6 zile de germinare.
c — Extract din rădăcini;
d — Din tulpiniță după 7 zile de germinare.



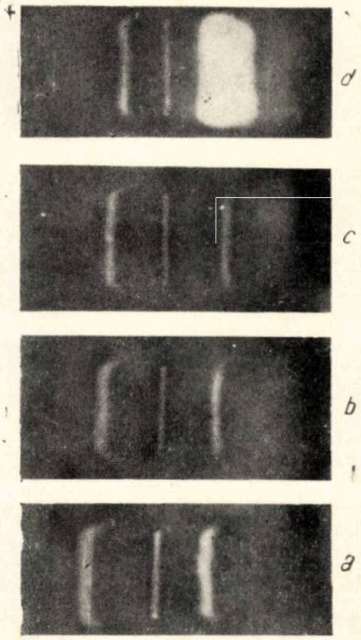
II

II. Extract din scutel sau endosperm:
a — Negerminat;
b — După 6 zile de germinare.



III

III. *a* — Extract din frunze de 14 zile;
b — Suc vacuolar din frunze de 14 zile.



IV

IV. Suc vacuolar obţinut din frunze de:
a — 11 zile;
b — 13 zile;
c — 15 zile;
d — 18 zile.

4. V. Alexandrescu, St. cerc. biochim., **5**, 7 (1962).
5. V. Alexandrescu, St. cerc. biochim., **5**, 399 (1962).
6. D. Schwartz, Science, **129**, 1287 (1959).
7. J. G. Scandalios, Planta, **69**, 244 (1966).
8. M. Miholjčić, B. Večerek, 3-d Meeting of the FEBS, Warsaw, 1966, Abstracts, p. 326.
9. M. D. Poulik, Nature, **180**, 1477 (1957).
10. G. C. Ashton, A. W. H. Braden, Aust. J. Biol. Sci., **14**, 248 (1961).
11. K. H. Tipples, R. Tkachuk, Cereal Chem., **42**, 111 (1965).
12. O. Frydenberg, G. Nielsen, Hereditas, **54**, 123 (1965).

THE ELECTROPHORETIC STUDY OF MAIZE AMYLASES DURING THE FIRST GROWING STAGES

SUMMARY

The enzymes of α-amylase type occur as 2—5 active fractions in all maize seed formations both at rest and after germination, as well as in leaves; β-amylase occurs as a single molecular form having the same electrophoretic mobility in all cases.

The germination leads to the appearance of strongly electronegative molecular forms of α-amylase type as well as to the appearance or intensification of one fraction weakly electronegative. These modifications occur in the first 4—6 days after germination.

The leaf contains one fraction of α-amylase type having electrophoretic mobility which changes in terms of age, nature of preparation (extract or sap) or if extract was or was not dialysed or lyophilized; this behaviour shows the presence on enzymograms of two α-glucanohydrolase types.

The enzymes of α-amylase type and β-amylase are found under the same molecular forms both in sap and in leaf cytoplasm.

The leaf contains the same molecular forms of α- and β-amylase as the stem; hence, the photosynthetic process does not influence α-amylase spectrum în leaves.

The activity of the weakly electronegative α-amylase type fraction appreciably differs from one preparation to another.

ST. CERC. BIOCHIM., 12, 4, 323–326 (1969)

METODĂ CRONOMETRICĂ DE DETERMINARE A ACTIVITĂȚII PEROXIDAZEI

I. ERAD, GH. OLTEANU, ZOIȚA MARCU

Rezumat. — Se prezintă o metodă cronometrică de determinare a activității peroxidazice, folosind o soluție de benzidină și măsurînd timpul după care o cantitate cunoscută de acid ascorbic este oxidată în condițiile descrise. Sfîrșitul reacției este apreciat vizual, după apariția culorii albastre. Eroarea maximă este de 5,5%. Metoda necesită utilaj simplu, fiind astfel accesibilă majorității laboratoarelor.

Peroxidaza este una dintre enzimele redox cu rol deosebit de important în metabolismul respirator și în sinteza substanțelor în special cu structură aromatică. Numeroase cercetări au arătat rolul și importanța acestei enzime în procesele de adaptare și de apărare [2].

Deoarece variația activității acestei enzime în funcție de multitudinea factorilor biotici și abiotici are semnificația unor modificări în bilanțul energetic și în sinteza și degradarea multor substanțe, ca și în reglarea metabolismului, s-a căutat să se pună la punct metode care să determine precis și rapid activitatea acestei enzime. Sînt cunoscute metode titrimetrice și colorimetrice care permit o evaluare suficient de bună a activității peroxidazei.

Metoda pe care o propunem are ca punct de plecare metoda adaptată de noi [2] după metoda titrimetrică de dozare a activității peroxidazei a lui Michlin și Bronovitkaia [3] și după metoda lui Bojarkin [1].

După adaptarea noastră [2], determinarea activității peroxidazei se bazează pe măsurarea cantității (variabile) de acid ascorbic oxidate într-un interval de timp ales. În noul procedeu pe care-l propunem, ea se bazează pe măsurarea timpului (variabil) necesar pentru a oxida, în condiții specificate, o cantitate cunoscută de acid ascorbic, aleasă o dată pentru totdeauna. În momentul în care tot acidul ascorbic a fost oxidat, se acumulează forma oxidată a benzidinei, care constituie indicator de sfîrșit de reacție.

Spre deosebire de metoda anterioară, nu mai este necesară titrarea și blocarea cu acid metafosforic. Noul procedeu necesită exclusiv acid ascorbic 1%, H_2O_2 1%, reactiv cu benzidină și cronometru (sau ceas cu secundar).

În metoda fotocolorimetrică rapidă de determinare a activității peroxidazei după Bojarkin [1], se măsoară timpul necesar pentru

ca să fie atinsă o anumită extincție. Această metodă pretinde ca utilaj fotocolorimetrul, fiind deci mai puțin accesibilă.

În experiențele noastre am urmărit găsirea condițiilor care să permită obținerea unor rezultate cu minimum de eroare.

MATERIAL ȘI METODĂ

Determinările s-au făcut pe frunze de plantule de porumb și frunze de plantule de grîu, recoltate la 5 zile după răsărire.

S-au folosit următoarele soluții: soluție tampon de acid acetic-acetat 0,1 N, pH = 4,7; soluție de acid ascorbic 1% în tampon, soluție H_2O_2 1% în tampon.

Soluția cu benzidină a fost preparată după Bojarkin [1].

Extractele s-au obținut astfel: 1 g material verde s-a mojarat cu 10, 15 sau 20 ml soluție tampon de acid acetic-acetat pH = 4,7. S-a lăsat o oră la extracție, după care s-a centrifugat 15 minute la 2500 rot/min. S-a folosit supernatantul.

Mersul general al determinării este următorul: în eprubetele pentru analiză se pun în ordine extractul, apa oxigenată, acidul ascorbic și reactivul cu benzidină. În momentul adăugării reactivului cu benzidină se marchează timpul.

Reactivii se adaugă cît mai repede posibil, fără pauză. După adăugarea ultimului reactiv, conținutul se agită circular, puternic și foarte scurt timp.

Se urmărește contra unui fond alb apariția culorii albastre, cînd se marchează din nou timpul.

Rezultatele se exprimă în gama de acid ascorbic oxidat/sec în condițiile de lucru descrise.

Ca pentru orice determinare enzimatică, se lucrează în condiții controlate de temperatură, care se specifică obligatoriu.

La determinările paralele executate după metoda cu pirocatehină se folosește același extract, în condițiile descrise în lucrarea anterioară [2].

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Pentru încercările de tatonare, de fixare a timpului, s-a folosit extractul de grîu, soluția de acid ascorbic, soluția de apă oxigenată și soluția de benzidină în proporția: 0,5; 0,2; 1,0; 2,0. S-au obținut timpii de 159″ pentru extracția în 20 ml tampon, 134″ pentru extracția în 15 ml tampon și 77″ pentru extracția în 10 ml tampon.

Timpul obținut se încadrează în limite convenabile de 1—3 min.

A fost ales raportul de extracție 1/20, putîndu-se realiza o mai bună manipulare a extractului la transvazarea în eprubeta de centrifugare și în manipulările ulterioare. Toate determinările ulterioare s-au făcut folosind acest raport de extracție.

În vederea stabilirii corelației între timpul de reacție și precizia metodei, s-a urmărit variația timpului de reacție în funcție de concentrația unui extract de frunze de plantule de porumb (tabela 1). Pentru aceasta

Tabela 1

Metoda cronometrică. Variația activității peroxidazei la 25°C. în funcție de concentrația extractului din frunze de porumb

Extract 1/20 ml	Tampon pH 4,7 ml	Timpul (secunde) necesar apariției culorii					Media	S ±	Eroare %	Gama acid ascorbic oxidat pe sec.
		1	2	3	4	5				
2,5	0	28,6	30,3	29,6	28,8	29,6	29,38	0,68	2,31	68,07
2,0	0,5	32,2	36,5	35,8	36,5	35,6	35,32	1,79	5,06	56,62
1,5	1,0	50,0	53,0	52,4	50,4	47,4	50,64	2,21	4,37	39,49
1,0	1,5	87,6	83,9	86,0	80,3	77,8	83,06	4,60	5,53	24,07
0,5	2,0	229,2	229,6	229,6	219,8	232,3	228,10	4,80	2,10	8,76

Pentru toate variantele s-au folosit: H_2O_2 1% — 1 ml
acid ascorbic 1% — 0,2 ml; benzidină 0,092% — 2 ml

s-au păstrat constante volumele și concentrațiile soluțiilor de H_2O_2, acid ascorbic și benzidină, precum și volumul total al mediului de reacție și s-a variat volumul extractului între 0,5 și 2,5 ml.

Diferența pînă la 2,5 ml se completează cu soluție tampon. S-au făcut 5 determinări.

În cazul nostru, în 0,2 ml acid ascorbic 1% se găsesc 2000 gama. Prin împărțirea acestei valori cu timpul mediu de oxidare, se obțin valorile pentru activitatea peroxidazei.

S-a ținut seama de posibilitatea ca materialul vegetal studiat să conțină o anumită cantitate de acid ascorbic care, adăugîndu-se cantității de acid ascorbic folosite de noi, ar putea să afecteze rezultatele. Pentru înlăturarea acestei surse de erori, s-a executat o determinare la care, în locul soluției de acid ascorbic, s-a adăugat același volum de tampon. S-a urmărit timpul necesar pentru apariția colorației albastre, care se scade din timpul determinării cu acid ascorbic adăugat.

Pentru extractele folosite de noi, apariția culorii albastre a fost practic instantanee. Totuși, în cazul unei activități peroxidazice slabe și la un conținut mare de acid ascorbic, în funcție de specie, soi, perioada de vegetație, nutriție și condiții de mediu, considerăm că rezultatele ar putea fi mult afectate. De aceea considerăm că determinarea martor este obligatorie.

Pentru studiul comparativ al metodelor s-au făcut determinări paralele după metoda cu pirocatehină [2], folosind un același extract de frunză de plantule de porumb (tabela 2).

Tabela 2

Metoda titrimetrică. Activitatea peroxidazei determinată prin metoda cu pirocatehină la 25 °C timp 120 s. pe extract de frunze de porumb 1/20 — g/ml

H_2O_2 **) 1% ml	Acid ascorbic 0,1% ml	Pirocatehină 0,02 M ml	Titrare cu I_2 în prezența de amidon — ml					Media	S ±	Eroare %
			1	2	3	4	5			
1,0	2,0	1,0	1,40	1,55	1,52	1,42	1,45	1,46	0,066	4,5
— *)	2,0	1,0	—	—	—	—	—	4,45	—	—

*) În locul soluției 1% H_2O_2 în tampon, s-a folosit 1 ml soluție tampon pH 4,7.
**) Pentru ambele variante s-au folosit: acid ascorbic 0,1% — 2 ml pirocatehină 0,02 M — 1 ml.

Determinarea activității peroxidazii prin metoda cronometrică, cu timp variabil, permite, în conformitate cu rezultatele prezentate în tabela 1, o apreciere a activității peroxidazei cu o eroare cuprinsă între 2,1 și 5,5%. Pentru determinări ale activității enzimatice, această eroare poate fi considerată foarte convenabilă. Este foarte adevărat însă că această metodă este în funcție de sensibilitatea ochiului pentru lumina albastră și de capacitatea de concentrare a executantului. De aceea, limitele erorii pot fi mai strînse sau mai largi decît cele constatate de noi, în raport cu subiectul care execută lucrarea. Ca atare, determinările trebuie să fie executate de același subiect în tot timpul experienței.

Comparativ cu rezultatele obținute prin metoda titrimetrică cu pirocatehină, erorile se găsesc între aceleași limite, deoarece aici determinarea depinde de uniformitatea agitării, de justa marcare a momentului de adăugare a soluției de pirocatehină, de sensibilitatea ochiului la titrarea în prezență de amidon.

CONCLUZII

Determinarea activității peroxidazei prin metoda cronometrică, în condițiile descrise, este convenabilă atît din punct de vedere al preciziei cît și al simplității. În raport cu alte metode, ea nu necesită aparate speciale sau soluții titrate, impune numai o cîntărire exactă a acidului ascorbic și păstrarea unor condiții de temperatură necesare oricărei determinări enzimatice.

Prezentat la redacție
la 12 noiembrie 1968

I.C.C.P.T. București-Fundulea
Secția de fiziologie și biochimie
Laboratorul de biochimie.

BIBLIOGRAFIE

1. Bojarkin A. N., Biohimiia, **16**, 352 (1951).
2. Brad I., St. cerc. biochim., **9**, 11 (1966).
3. Ermakov A. I., Arasimovici V. V., Smirnova-Ikonikova M. I., Muri I. K., *Metodî biochimicskova issledovania rastenii*, Moscova, Leningrad, 1952.

CHRONOMETRICAL METHOD FOR THE DETERMINATION OF PEROXIDASE ACTIVITY

SUMMARY

A chronometrical method for determining peroxidase activity, using a benzidine solution is described. The time required for the oxidation of a precise amount of ascorbic acid under the conditions described, is determined. The end of the reaction is visually appreciated by the appearence of a blue colour. The maximum error is 5. 5%. The method requires a simple equipment, being thus largely accesible.

ST. CERC. BIOCHIM., 12, 4, 327–332 (1969)

MODIFICĂRI MOLECULARE ALE VICILINEI RĂMASE NEHIDROLIZATĂ ÎN CURSUL GERMINAȚIEI SEMINȚELOR DE MAZĂRE (*PISUM SATIVUM*)

LUCIA BUZILĂ

Rezumat. — S-a constatat că în procesul de germinație al semințelor de mazăre, moleculele de vicilină prezintă alterări structurale manifestate printr-o creștere a mobilității electroforetice și o scădere a eterogenității în medii gelificate ce conțin uree 8 M.
Se discută rezultatele în raport cu posibilitatea ca acest proces să reflecte o îmbătrînire a vicilinei la nivel molecular.

Îmbătrînirea moleculelor proteice a fost observată *in vivo* la hemoglobină [1] și la unele enzime eritrocitare [2]. Apariția unor proprietăți chimice noi, care diferențiază moleculele mai bătrîne de cele tinere, poate fi cauzată de : cîștigarea sau pierderea unor grupări sau unor componenți chimici, reducerea punților disulfidice sau oxidarea celor sulfhidrilice, deplieri parțiale, cu tranziții de conformație, alterări ale structurii primare, prin convertirea unui aminoacid cu altul [1].

Studierea acestui proces se limitează în prezent la proteinele eritrocitelor care, putînd fi separate în celule tinere și bătrîne, permit analizarea conținutului celular în raport cu vîrsta eritrocitului.

Problema diferențierii moleculelor „tinere" de cele „bătrîne" poate fi abordată utilizînd ca model experimental sămînța germinată. Proteinele de rezervă se sintetizează în semințe în cursul coacerii acestora, iar în cursul germinației ele suferă o continuă hidroliză. Absența oricărui proces sintetic la nivelul proteinelor de rezervă în semințele care germinează [3] deschide posibilitatea studierii, în diferite faze de germinație, a proprietăților fizico-chimice ale proteinelor de rezervă rămase nehidrolizate.

În lucrarea prezentă am cercetat cîteva proprietăți fizicochimice și imunochimice ale vicilinei izolate din semințe de mazăre negerminate și din semințe germinate timp de 10 și 20 de zile.

MATERIAL ȘI METODĂ

Germinarea semințelor și izolarea vicilinei. Semințe de mazăre (*Pisum sativum*) din soiul *Ceres* s-au germinat la temperatura laboratorului, în cutii Petri căptușite cu hîrtie de filtru umezită. După 10, respectiv 20

de zile, s-a colectat un număr suficient de seminţe cu dezvoltare egală şi s-au disociat în cotiledoane şi ax embrionar. Cotiledoanele s-au mojarat cu nisip de cuarţ, adăugînd o soluţie de NaCl 0,2 M, tamponată cu fosfat la pH = 7,0, în raport de 1 parte material/5 părţi extractant. Un procedeu similar s-a aplicat şi pentru seminţele negerminate.

Din omogenate s-a izolat vicilina, după tehnica lui J. Kloz şi V. Turkova [4], aşa cum a fost descrisă într-o altă lucrare [5]. Din seminţe negerminate şi germinate 10 şi 20 zile s-a izolat vicilina pură, prin cromatografie pe DEAE-celuloză. Eluţia s-a efectuat cu un tampon fosfat 0,02 M, de pH 8,0, utilizînd un gradient de molaritate crescător în NaCl, de la 0,2 M la 0,6 M [6]. S-au contopit numai probele cuprinse sub piscul care nu se adsoarbe pe schimbător (Vicilina A).

Analiza electroforetică, imunoelectroforetică şi prin dublă difuzie. Electroforeza s-a efectuat în geluri de agaroză, cu şi fără uree 8 M, şi de poliacrilamidă, cu uree. Condiţiile de analiză au fost descrise în altă lucrare [5].

Imunoelectroforeza a fost efectuată în aceleaşi condiţii ca electroforeza în gel de agaroză. S-au întrebuinţat seruri imune de iepure anti-vicilină şi anti-proteine totale din sămînţă. Prepararea lor a fost descrisă în alte lucrări [5], [6].

Dubla difuzie s-a efectuat în gel de agaroză, cu NaCl 0,145 M, utilizînd tehnici de identificare curente [7].

Cromatografia în strat subţire pe gel de Sephadex G—200. S-a utilizat Sephadex G—200 superfin, într-o soluţie de NaCl 0,145 M, tamponată cu fosfat la pH 7,0 [5], [6].

REZULTATE

Toate trei vicilinele obţinute din seminţele negerminate şi din cele germinate timp de 10, respectiv 20 zile, prezintă o reacţie de identitate totală la analiza prin dubla difuzie cu ser de iepure antivicilină. Ele nu pot fi deosebite prin cromatografie în strat subţire pe gel de Sephadex G—200, semn că au o greutate moleculară identică sau foarte apropiată.

Diferenţe între cele 3 viciline se observă la examinarea mobilităţii lor electroforetice în gel de agaroză fără uree (fig. 1) Mobilitatea electroforetică a vicilinei creşte cu durata de germinaţie a seminţelor din care ea provine. Aceste date au fost confirmate şi de analiza imunoelectroforetică a probelor, linia de precipitare pentru vicilină deplasîndu-se din ce în ce mai aproape de anod, în raport direct cu timpul de germinaţie (fig. 1).

Electroforeza în gel de agaroză cu uree 8 M permite separarea în 6 benzi a vicilinei din sămînţa negerminată (fig. 2).

Eterogenitatea constatată este considerabil micşorată la vicilina din seminţele germinate timp de 10 şi 20 de zile, la care se constată că apar nete numai fracţiunile cu mobilitate mare.

În gel de poliacrilamidă, eterogenitatea vicilinei apare și mai marcată (fig. 3).

Se evidențiază 8 benzi, care au intensități diferite. În aceste condiții din spectrul electroforetic al vicilinelor din semințele germinate timp de

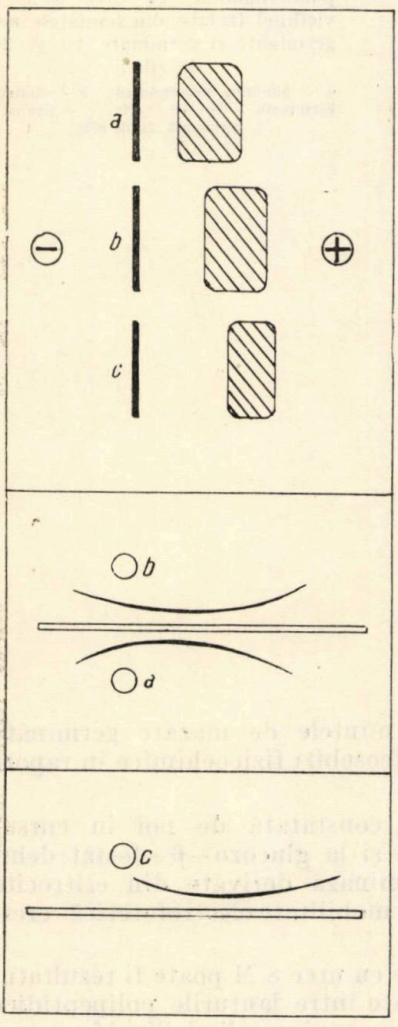


Fig. 1. — Electroforeza și imunoelectroforeza vicilinei izolată din semințele negerminate și germinate 10 și 20 zile: *a* — Sămînța negerminată; *b* — Sămînța germinată de 10 zile; *c* — Sămînța germinată de 20 zile; Ser de iepure anti-vicilină.

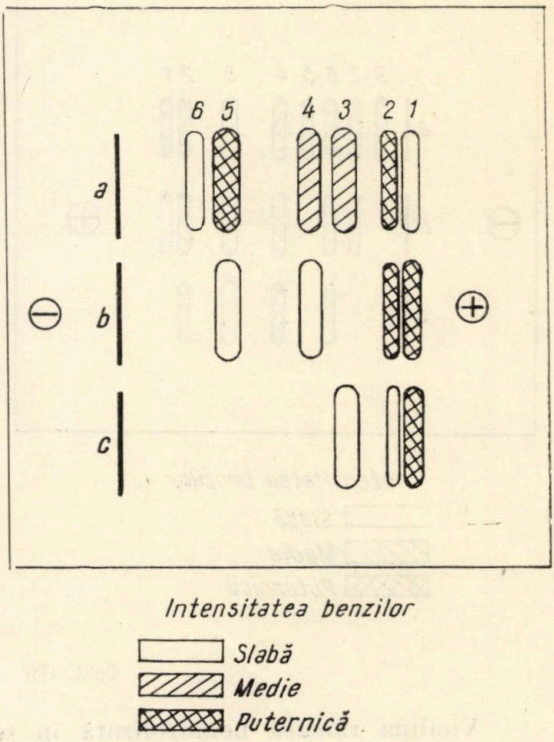


Fig. 2. — Electroforeza în gel de agaroză cu uree 8 M a vicilinei izolate din semințele negerminate și germinate 10 și 20 de zile: *a* — Sămînța negerminată; *b* — Sămînța germinată de 10 zile; *c* — Sămînța germinată 20 de zile.

10 și 20 de zile lipsesc sau devin mai puțin intense benzile din zona din fața stratului. Se observă că raportul cantitativ dintre diferitele fracțiuni

este schimbat, cele mai afectate fiind porţiunile cu mobilitate electroforetică mare, care dispar aproape complet din electroforegramele vicilinei de 20 de zile.

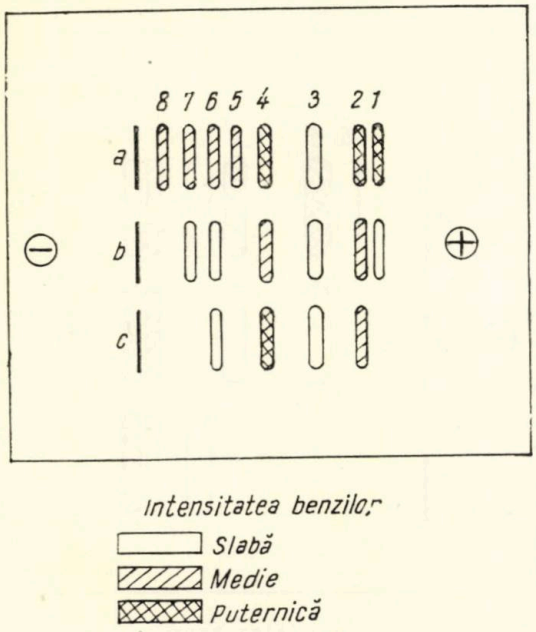


Fig. 3. — Electroforeza în gel de poliacrilamidă cu uree 8 M a vicilinei izolate din seminţele negerminate şi germinate 10 şi 20 de zile:

a — Sămînţa negerminată; *b* — Sămînţa germinată de 10 zile; *c* — Sămînţa germinată 20 de zile.

DISCUŢII

Vicilina rămasă nehidrolizată în seminţele de mazăre germinate timp de 10, respectiv 20 de zile, prezintă deosebiri fizicochimice în raport cu vicilina din sămînţa negerminată.

Creşterea mobilităţii electroforetice, constatată de noi în cursul „îmbătrînirii" vicilinei, a fost evidenţiată şi la glucozo—6—fosfat dehidrogenaza şi glutamic-oxalacetic transaminaza derivate din eritrocite umane, tinere şi bătrîne, ultimele avînd o mobilitate electroforetică crescută [2].

Eterogenitatea evidenţiată în gelurile cu uree 8 M poate fi rezultatul disocierii moleculei, cu formarea de agregate între lanţurile polipeptidice disociate şi cele nedisociate [6], astfel că „omogenizarea" vicilinei în cursul germinaţiei poate reflecta alterări ale moleculei la nivelul lanţurilor polipeptidice componente.

Deosebirile constatate între vicilinele de 10 şi 20 de zile, pe de o parte, şi vicilina din sămînţa negerminată, pe de altă parte, nu pot fi puse pe socoteala hidrolizei parţiale a vicilinei, din următoarele motive:

a. Din seminţele germinate s-a izolat numai fracţiunea proteică care, la precipitare cu sulfat de amoniu şi cromatografie pe DEAE-celuloză, s-a comportat identic cu vicilina din sămînţa negerminată.

b. Vicilinele din semințele germinate au avut aceeași greutate moleculară și aceeași antigenicitate ca și vicilina din sămînța negerminată.

c. Scindarea vicilinei din sămînța de mazăre în cursul germinației are loc treptat, în cotiledoanele semințelor existînd atît celule ce conțin vicilina intactă, cît și celule în care vicilina este deja fragmentată sau integral hidrolizată [8].

Aceste constatări avansează ideea că modificările observate ar putea fi urmarea unui proces preliminar care pregătește proteina pentru hidroliza enzimatică [9], [10]. Declanșarea procesului hidrolitic ar putea fi determinată nu numai de activarea proteazelor intracelulare [9], ci și de modificarea structurii proteinelor, pe măsură ce cotiledoanele îmbătrînesc, acestea devenind astfel atacabile de proteazele preexistente în celule, chiar la nivelul la care se localizează proteinele de rezervă [11].

În favoarea acceptării unui astfel de proces pot fi aduse acele părți din lucrările lui N. A. Rodionova (vezi de ex. [12]), care sînt consacrate studiului proprietăților fizico-chimice ale vicilinei rămase nehidrolizată în sămînța de năut, în diferite faze de germinație. Astfel, vicilina rămasă nehidrolizată în a 4—a, respectiv a 8-a zi de germinație, diferă de vicilina din sămînța negerminată prin cantitatea azotului aminic, rotația specifică, vîscozitatea relativă, capacitatea de reținere a apei și eterogenitatea curbelor de salifiere.

Modificările constatate de N. A. Rodionova, adăugate la observațiile noastre din această lucrare, ne îndreptățesc să considerăm că în celulă vicilina suferă o serie de alterări structurale care pot fi puse pe seama „îmbătrînirii" moleculei.

Cauzele care determină aceste alterări sînt greu de apreciat, atît în cazul vicilinei cît și în acela al hemoglobinelor; în prezent, nu putem preciza dacă modificările constatate sînt provocate de alterarea proceselor metabolice, în urma îmbătrînirii celulei, sau dacă ele reprezintă un fenomen de îmbătrînire a moleculei în urma uzării sale metabolice, independent de vîrsta celulei în care se găsește. Din ultima alternativă ar rezulta că vicilina este atacată de proteazele intracelulare abia în momentul cînd structura ei fizico-chimică este alterată semnificativ în raport cu cea „nativă" inițială.

CONCLUZII

Vicilina din semințele de mazăre germinate prezintă o mobilitate electroforetică mai mare și o eterogenitate a subunităților mai mică decît vicilina din sămînța negerminată.

Aceste deosebiri pot reprezenta un fenomen de îmbătrînire a moleculei în urma uzării sale metabolice.

Mulțumesc Dr. V. Gheție pentru sugestiile date la interpretarea datelor experimentale.

Prezentat la redacție
la 14 ianuarie 1969

Sectorul de imunochimie
Institutul de biochimie al Academiei
Republicii Socialiste România
București

BIBLIOGRAFIE

1. H. Walter, Nature, **198**, 189 (1963).
2. H. Walter, F. W. Selby, J. R. Francisco, Nature, **208**, 76 (1965).
3. V. Gheţie, St. cerc. biochim., **9**, 91 (1966).
4. J. Kloz, V. Turkova, Biol. plan., **5**, 29 (1963).
5. V. Gheţie, L. Buzilă, Rev. roum. biochim., **5**, 271 (1968).
6. L. Buzilă, Rev. roum. biochim., **4**, 103 (1967).
7. J. Rosa, D. Labie, Nature, **196**, 901 (1962).
8. L. Buzilă, St. cerc. biochim., **12**, (1969).
9. V. Gheţie, Rev. roum. biochim., **3**, 363 (1966).
10. V. Gheţie (in) Proceddings of the Symposium on the mutational process, Academia, Publ. House of Czech. Acad. Sci., 1965, 489.
11. L. Y. Yatsu, T. J. Sacks, Arch. Biochem. Biophys., **124**, 466 (1968).
12. N. A. Rodionova, Tr. Glavn. Bot. Sada, **7**, 32 (1960).

MOLECULAR MODIFICATIONS OF THE VICILLIN UNDIGESTED DURING PEA SEEDS (PISUM SATIVUM) GERMINATION

SUMMARY

During the germination process of pea seeds vicillin molecules display some structural alterations expressed by an increase in electrophoretical mobility and a decrease in the heterogeneity, in gel media containing 8 M urea.

The results in relation to the possibility that this process reflects the aging of vicillin at a molecular level are discussed.

ST. CERC. BIOCHIM., 12, 4. 333–340 (1969)

CARACTERIZAREA SPECTROFOTOMETRICĂ A ADN DUPĂ IRADIERE *IN VIVO*
VI. — UNELE PROPRIETĂȚI FIZICO-CHIMICE ALE ADN NOU SINTETIZAT ÎN FICATUL ÎN REGENERARE AL ȘOBOLANILOR IRADIAȚI

MARIA FURNICĂ, P. GEORGESCU, G. BOTEZ

Rezumat. — Șobolani la care s-a excizat 60% din ficat au fost iradiați la 15 ore de la hepatectomie parțială cu 900 r. După 10 zile de la iradiere s-a extras ADN nou sintetizat de ficatul regenerat al animalelor iradiate. Acest ADN, care nu a suferit acțiunea fizico-chimică a iradierii, prezintă unele modificări asemănătoare cu cele ale ADN extras de la șobolanii iradiați fără hepatectomie: efect hipercromic mai redus sub acțiunea căldurii și a DN-azei pancreatice, Tm = 90°C, lățimea tranziției situată într-un domeniu de temperatură mai ridicată. Se presupune că aceste modificări rezultă din reparația anormală a catenelor de ADN în organismul iradiat cu doze letale.

În lucrări anterioare [1]—[6] am pus în evidență unele modificări fizico-chimice ale acidului desoxiribonucleic extras din ficatul șobolanilor iradiați cu doze letale de radiații X. Aceste modificări, manifestate printr-o stabilitate crescută la acțiunea agenților denaturanți, nu apar după iradierea cu doze neletale de radiații și nici în faze timpurii ale iradierii. Problema pe care ne-am pus-o a fost găsirea unei explicații pentru apariția tardivă a modificărilor care apar în macromolecula de ADN, iradiată *in vivo* cu doze letale. Dacă efectul se datorește acțiunii fizico-chimice a iradierii, și nu este rezultatul unor reacții ulterioare, induse tot de iradiere, nu ar trebui să găsim modificări în ADN nou sintetizat de organismul iradiat. Acest aspect urmează să-l lămurim în nota de față.

Deoarece cantitatea de ADN sintetizată de ficatul adult este foarte mică [7] și mitoza foarte rară (1 celulă din 10.000—20.000) [8], ne-am propus să stimulăm proliferarea ficatului adult de șobolan prin hepatectomie parțială lărgită. În ficatul în regenerare, biosinteza de ADN începe după 17—18 ore de la hepatectomie și se reduce treptat pînă în ziua a 10-a, cînd ficatul este complet regenerat [9], [10]. Pentru a urmări efectul iradierii organismului asupra ADN nou sintetizat, era necesar ca iradierea animalelor de experiență să se realizeze înainte de a se începe sinteza *de novo* a ADN. Pe această cale am considerat că putem compara modificările ADN din celulele cu proliferare intensă, cum sînt celulele ficatului în regenerare, cu modificările ADN din ficatul în repaus.

MATERIAL ŞI METODĂ

Experienţele au fost efectuate pe 100 şobolani Sprague-Dawley, de 150—200 g, împărţiţi în 3 loturi : I — şobolani normali ; II — şobolani hepatectomizaţi parţial, sacrificaţi după 10 zile de la operaţie ; III — şobolani hepatectomizaţi parţial, iradiaţi după 15 ore şi sacrificaţi după 10 zile de la operaţie.

Hepatectomia parţială s-a realizat după tehnica Higgins-Anderson [11], excizîndu-se 60—65% din ficat (2 din lobii hepatici stîngi) sub anestezie cu eter. La 15 ore de la hepatectomie, animalele operate au fost iradiate cu 900 r (doza în aer).

Din ficatul regenerat, după 10 zile de la hepatectomie, s-a extras ADN prin metoda Zamenhof-Griboff-Marullo [12]. Acest ADN a fost purificat cu amestec cloroform-alcool octilic (5 :1), pînă la obţinerea unui ADN pur, cu reacţie Lowry negativă.

Cu ADN purificat, dizolvat în NaCl 0,01 M, am efectuat următoarele teste :

Efectul căldurii [13]. ADN în concentraţia 0,1% se încălzeşte 15 minute pe baie de apă, la 90 °C, după care se răceşte brusc. Se diluează la 10 γ/ml cu NaCl 0,01 M şi se măsoară absorbţia la 260 mμ. Se compară rezultatul cu absorbţia în UV a probei înainte de încălzire.

Caracteristicile termice (Tm, Δ 2/3, ΔT) s-au măsurat la spectrofotometrul CF_4 Optica Milano, la care s-a adaptat un dispozitiv de termostatare. ADN a fost dizolvat în clorură de sodiu 0,15 M + citrat trisodic 0,015 M. Probele s-au încălzit în cuva de cuarţ a spectrofotometrului, pînă la 97°—100°C, cu ajutorul unui ultratermostat cu baie de etilenglicol. S-a determinat extincţia în funcţie de temperatură, între 25°—100 °C, la lungimile de undă 220—320 mμ. Temperatura medie de tranziţie (Tm), lăţimea tranziţiei (Δ 2/3) şi mărimea ΔT s-au calculat după formula obişnuită [14], [3].

Efectul desoxiribonucleazei pancreatice. Gradul de denaturare a acidului desoxiribonucleic de către DN-aza pancreatică a fost urmărit prin metoda Strauss şi Wahl [15], în următoarele condiţii : la 100 γ ADN, dizolvat în 1,8 ml tampon fosfat de pH 7,4, se adaugă 4 γ DN-ază, dizolvată în NaCl 0,9%, şi 0,1 ml $MgCl_2$ 4%. În proba martor, DN-aza este în prealabil inactivată prin încălzire timp de 10' la 90° C. Proba în alb nu conţine ADN. Toate probele se incubează 30' la 37°C, după care reacţia se opreşte prin încălzire timp de 10' la 60° C. În final, proba se diluează la 10 γ ADN/ml şi i se determină absorbţia în ultraviolet, între 220—320 mμ.

Viteza de reacţie a DN-azei pancreatice am cercetat-o prin metoda Kunitz, adăugînd DN-ază direct în cuva spectrofotometrului şi urmărind creşterea absorbţiei în funcţie de timp, la temperatura camerei, aşa cum am arătat într-o lucrare anterioară [5].

REZULTATE

1. Excizia a 2/3 din ficat iniţiază un ritm rapid de proliferare a porţiunii rămase. După 10 zile de la hepatectomie, ficatul a fost complet regenerat, prezentînd un aspect hipertrofic : ca volum, el depăşeşte

chiar volumul inițial al ficatului de șobolan adult. La șobolanii iradiați, regenerarea ficatului nu este împiedicată, dar volumul final este mai redus decît la martorii neiradiați.

2. Extractele de ADN în soluție de NaCl 2 M, obținute din ficatul regenerat, manifestă unele proprietăți diferite de acelea ale extractelor

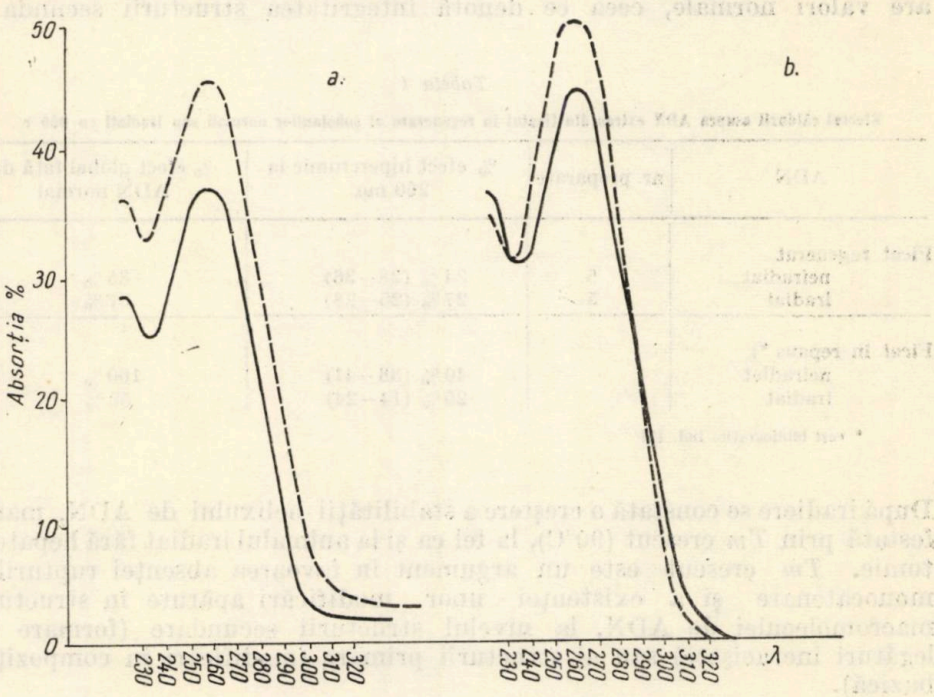


Fig. 1. — Influența căldurii asupra spectrului de absorbție în ultraviolet a ADN: *a* — nou sintetizat de ficatul regenerat, *b* — nou sintetizat de ficatul regenerat după iradiere. — nativ — — — denaturat termic

similare de ADN din ficatul în repaus. Astfel, cele dintîi sînt cu mult mai puțin vîscoase decît acestea din urmă. Pe de altă parte, deproteinizarea lor a fost mai greu de realizat decît de obicei, pentru obținerea unui preparat pur fiind necesare aproximativ 12 deproteinizări cu amestec de cloroform-alcool octilic.

3. *Efectul căldurii.* În figura 1 am expus rezultatele acțiunii căldurii asupra absorbției în UV a ADN extras din ficatul în regenerare, de la șobolani normali și iradiați. Pentru comparație, am redat în tabela 1 rezultatele obținute în aceleași condiții pe ADN extras din ficat în repaus, de la șobolani normali și iradiați [1]. Se observă din tabel că, sub acțiunea căldurii, ADN din ficatul regenerat prezintă un efect hipercromic ceva mai redus decît ADN normal (85%). ADN sintetizat de șobolanul iradiat prezintă un efect hipercromic care reprezintă doar 67% din efectul normal. Făcînd comparație cu rezultatele obținute anterior pe ADN care a suferit direct acțiunea iradierii, extras de la animale nehepatectomizate, se observă că efectul este mai puțin pronunțat.

4. *Caracteristicile termice.* Determinarea acestora a permis obținerea unor date suplimentare asupra comportării ADN la acțiunea căldurii (tabela 2). Comparînd, în continuare, rezultatele obținute pe ADN nou sintetizat cu cele observate la ADN din ficatul în repaus, constatăm:

— Temperatura medie de tranziție (Tm) a ADN nou sintetizat are valori normale, ceea ce denotă integritatea structurii secundare.

Tabela 1

Efectul căldurii asupra ADN extras din ficatul în regenerare al șobolanilor normali sau iradiați cu 900 r

ADN	nr. preparate	% efect hipercromic la 260 mμ	% efect global față de ADN normal
Ficat regenerat			
neiradiat	5	34% (28—36)	85%
iradiat	5	27% (25—28)	67%
Ficat în repaus *)			
neiradiat		40% (38—41)	100%
iradiat		20% (14—24)	50%

* vezi bibliografia, ind. [1]

După iradiere se constată o creștere a stabilității helixului de ADN, manifestată prin Tm crescut (90°C), la fel ca și la animalul iradiat fără hepatectomie. Tm crescut este un argument în favoarea absenței rupturilor monocatenare și a existenței unor modificări apărute în structura macromoleculei de ADN, la nivelul structurii secundare (formare de legături încrucișate) sau al structurii primare (modificări în compoziția bazică).

Tabela 2

Proprietățile ADN nou sintetizat de ficatul în regenerare al șobolanilor normali sau iradiați cu 900 r, după 10 zile de la iradiere

ADN	Tm (°C)	$\Delta 2/3$		T_{25} (°C)	ΔT (°C)
		domeniul	°C		
Ficat regenerat					
neiradiat	86,5	75°...95°	20	94	7,5
iradiat	90	81,9° .97°	15,1	92,4	2,4
Ficat în repaus *)					
neiradiat	86	75°...88°	13	90	4
iradiat	90	82°...95°	13	95	5

* vezi bibliografia, ind. [3]

— Lățimea tranziției (Δ 2/3) are valori ceva mai crescute la ADN din ficatul regenerat decît la cel din ficatul în repaus, dovedind o mai mare heterogenitate a macromoleculei. După iradiere, această heterogenitate macromoleculară tinde să se reducă.

— Mărimea ΔT, reprezentînd diferența dintre temperatura corespunzătoare absorbției la 25° C a ADN denaturat (T_{25}) și valoarea Tm, este mai redusă la ADN nou sintetizat de animalul iradiat, față de cel neiradiat. Scăderea mărimii ΔT ar putea oglindi o tendință de renaturare a acestui ADN.

5. *Efectul desoxiribonucleazei.* Reiese din tabela 3 că ADN nou sintetizat se comportă față de acțiunea denaturată a desoxiribonucleazei pancreatice ca și ADN normal (efect hipercromic 30%). Se aduce

Tabela 3

Efectul desoxiribonucleazei pancreatice asupra ADN extras din ficatul în regenerare al șobolanilor normali sau iradiați cu 900 r

ADN	nr. preparate	% efect hipercromic la 260 mμ	% efect global față de ADN normal
Ficat regenerat			
neiradiat	5	31% (29–33)	106%
iradiat	5	21% (20–23)	72%
Ficat în repaus *)			
neiradiat		29% (28–31)	100%
iradiat		15% (13–17)	51%

* vezi bibliografia, ind. [5]

astfel o dovadă în plus asupra integrității structurii secundare a acestui ADN. ADN sintetizat de șobolanii iradiați prezintă rezistență la acțiunea DN-azei, creșterea absorbției la 260 mμ reprezentînd doar 72% din efectul total. Se observă că sub acțiunea DN-azei, ca și sub acțiunea căldurii, rezistența acestui ADN este totuși mai mică decît în cazul ADN care a suferit direct acțiunea iradierii (51% din efectul total) [5].

Efectul DN-azei asupra ADN nou sintetizat, iradiat sau neiradiat, este ilustrat și în figura 2. În cazul ADN neiradiat, efectul hipercromic atinge 32% (fig. 2*a*) în timp ce la ADN extras de la șobolanii iradiați el atinge doar 20% (fig. 2 *b*).

Viteza de reacție a DN-azei cu diferite preparate de ADN este ilustrată în figura 3. Se constată în primele minute de incubare, o viteză crescută de reacție cu DN-aza la preparatele de ADN extrase de la șobolanii hepatectomizați, după care reacția devine ceva mai lent decît la ADN normal. Acțiunea DN-azei cu diferitele preparate extrase de la șobolanii iradiați este mai lentă. Se constată și în acest caz o asemănare de comportare față de DN-ază între ADN iradiat și cel sintetizat de un organism iradiat.

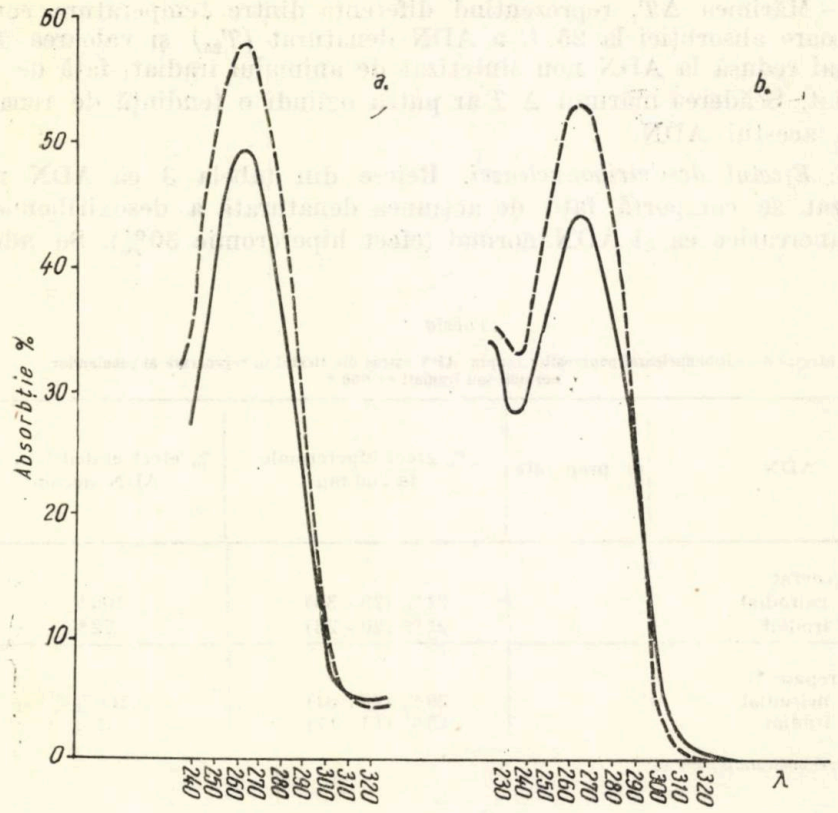


Fig. 2. — Influența desoxiribonucleazei pancreatice asupra spectrului de absorbție în ultraviolet a ADN :

a — nou sintetizat de ficatul regenerat, *b* — nou sintetizat de ficatul regenerat după iradiere.
— DN-ază inactivă — — — DN-ază activă

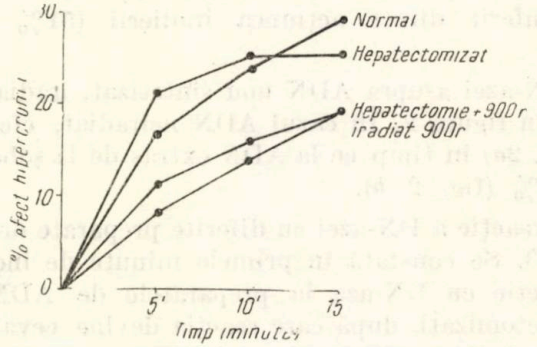


Fig. 3. — Viteza de reacție a desoxiribonucleazei pancreatice cu ADN extras de la șobolani normali, iradiați cu 900 r, hepatectomizați, hepatectomizați și iradiați cu 900 r.

DISCUȚII

Dacă regenerarea ficatului la șobolanul parțial hepatectomizat este un proces care se desfășoară în mod natural, fără intervenția unor factori externi, nu același lucru era de așteptat în cazul orgnismului iradiat. Totuși, regenerarea ficatului după hepatectomie parțială are loc și în organismul iradiat, proliferarea celulară menținîndu-se chiar și în prezența unor leziuni cromozomiale considerabile [16]. În cazul dozelor neletale de radiații proliferarea celulară intensă ajută la eliminarea celulelor lezate și la reparația leziunilor cromozomiale [17], în timp ce, în condiții de iradiere cu doze mari, moartea animalelor pare să se datorească acumulării leziunilor cromozomiale și dereglării progresive a mecanismelor de adaptare și reparație a radioleziunii.

Din experiențele noastre a reieșit că ADN nou sintetizat de ficatul animalelor iradiate prezintă unele modificări fizico-chimice, manifestate printr-o stabilitate crescută a helixului la acțiunea agenților denaturanți. Aceleași modificări, dar mai accentuate, le-am găsit și la ADN extras de la șobolanii iradiați fără hepatectomie [1], [3], în care caz impactul radiant a putut acționa direct asupra macromoleculei. Este logic să considerăm că modificările pe care le-am găsit în ADN nou sintetizat de către organismul iradiat sînt o rezultantă a lezării matriței de ADN.

Rămîne de explicat mecanismul intim care stă la baza modificărilor constatate de noi. Se știe că impactul radiant — sau radicalii OH apăruți după iradiere — pot produce rupturi monocatenare în macromolecula de ADN sau leziuni la nivelul bazelor nucleotidice [18], [20]. Celula posedă un mecanism de reparație a acestor leziuni la nivelul macromolecular, pus în evidență la bacteriile iradiate. Anumite enzime „de reparație" intervin treptat, scindînd nucleotidele lezate (endonucleaza, exonucleaza) și sintetizînd în loc un nou fragment, cu nucleotide normale (polimeraza, ligaza), conform informației genetice conținute în catena complimentară [21], [22]. În acest fel se reface un ADN bicatenar, cu structură asemănătoare celei dinainte de iradiere. În lucrări anterioare am constatat și noi că în cazul ADN de la mamifere are loc un proces analog : după doza de 300 r, ADN extras la 10 zile de la iradiere prezintă proprietățile unui ADN normal [1], [3], [4], [5]. Dar tot din rezultatele noastre reiese că în cazul iradierii cu doze letale, deși aceste reparații par să aibă loc (am demonstrat integritatea structurii secundare a ADN, ind. [3], [4], [6]), nu se reface ADN inițial, ci unul cu proprietăți modificate, manifestate printr-o stabilitate crescută a structurii secundare. Aceste rezultate sugerează că mecanismul care intervine în reparația leziunii de iradiere cu radiații ionizante diferă după cum dozele sînt letale sau neletale. Dacă acest ADN modificat servește ca matriță, caracteristicile sale se transmit și se amplifică în ADN nou sintetizat, dînd naștere unor macromolecule incompatibile cu viața.

CONCLUZII

ADN nou sintetizat de ficatul în regenerare al șobolanului iradiat cu o doză letală de radiații ionizante prezintă unele modificări în structura secundară, manifestate printr-o anumită rezistență la acțiunea DN-azei pancreatice și a căldurii și prin Tm crescut.

Aceste modificări sînt analoage cu cele constatate la ADN care a suferit direct acţiunea iradierii.

Prezentat la redacţie la 26 martie 1969

Institutul oncologic Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. Maria Furnică, St. cerc. biochim., **10**, 227 (1967).
2. Maria Furnică, Fiziol. Norm. Patol. **XIII**, 345 (1967).
3. Maria Furnică, Rev. roum. Biochim., **5**, 113 (1968).
4. Maria Furnică, Rev. roum. Biochim., **5**, 199 (1968).
5. Maria Furnică, St. cerc. biochim., **11**, 261 (1968).
6. Maria Furnică, St. cerc. biochim., **11**, 377 (1968).
7. M. Albert, N. Bucher, Cancer Res., **20**, 1514 (1960).
8. L. G. Stevenson, H. J. Curtis, Radiation Res., **15**, 774 (1961).
9. B. D. Carter, B. E. Holmes, L. K. Mee, Acta Radiologica, **46**, 655 (1956).
10. G. Giudice, F. T. Kenney, G. D. Novelli, Biochim. Biophys. Acta, **87**, 171 (1964).
11. G. M. Higgins, M. Anderson, Arch. Path. **12**, 186 (1931).
12. G. P. Colowick, N. O. Kaplan, *Methods in Enzymology*, Academic Press Inc. Publishers, New York, 1957, vol. 3, p. 696.
13. A. T. Ganesan, J. Lederberg, J. Mol. Biol., **9**, 683 (1964).
14. H. R. Mahler, A. S. Pereira, J. Mol. Biol., **5**, 325 (1962).
15. B. R. Strauss, R. Wahl Biochim. Biophys. Acta, **80**, 116 (1964).
16. T. T. Puck, P. I. Marcus, J. Expt. med., **103**, 653 (1956).
17. H. J. Fabrikant Radiology, **88**, 767 (1967).
18. J. J. Weiss, *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, Academic Press, New York, 1964, vol. 3, p. 103.
19. P. Alexander, J. T. Lett, H. Moroson, K. A. Stacey, în *„Immediate and low-level effects of ionizing radiation"*, A. H. Buzzati-Traverso, Ed. Taylor Francis LTP Londra 1960, p. 7.
20. U. Hagen, K. Keck, F. Zimmerman, H. Kröger, Strahletherapie, **132**, 40 (1967).
21. R. Haynes Radiation Res. Supl. 6, 1 (1966).
22. W. Szybalski Radiation Res. Supl., 7, 147 (1967).

SPECTROPHOTOMETRICAL CHARACTERIZATION OF DNA AFTER IRRADIATION *IN VIVO*. VI. SOME PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF DNA NEWLY SYNTHETISED IN REGENERATING LIVER OF IRRADIATED RATS

SUMMARY

Rats with 60% excised liver were irradiated 15 hours after partial hepatectomy with 900 r. After 10 days, one extracted the newly synthetised DNA from the regenerated liver of irradiated rats. This DNA, not undergoing any physico-chemical action of irradiation, presents some modifications similar to those of DNA from the liver of irradiated rats without hepatectomy : a poor hyperchromic effect under heat or DNase action, Tm = 90°, transition width within a range of higher temperatures. One supposes that these modifications are a result of the unusual DNA strands repair in the lethally irradiated rats.

ST. CERC. BIOCHIM., 12. 4, 341–344 (1969)

TRANSPORTUL METIONINEI MARCATE CU ^{75}SE-SELENOMETIONINĂ ÎN CELULELE TUMORALE ASCITICE EHRLICH IRADIATE CU RAZE X

I. HIRSCHFELD, I. KREPSZ, MARIA FĂGĂRĂȘAN

Rezumat. — În celulele tumorale ascitice Ehrlich, iradiate cu 500—1000—5000R, se remarcă creşterea influxului şi a difuziei prin schimb a metioninei faţă de martori. Stimularea influxului metioninei scade cu creşterea dozei, pe cînd stimularea difuziei prin schimb este proporţională cu doza de iradiaţie. Se consideră o acţiune diferenţiată a iradiaţiei asupra procesului de difuzie şi a transportului activ şi se discută mecanismele posibile.

Iradierea *in vitro* a celulelor cu raze X provoacă o gamă întreagă de alterări biochimice, funcţionale, morfologice şi genetice [1]. Creşterea permeabilităţii capilare în urma iradiaţiei este de mult timp cunoscută [2]. Iradierea întregului organism, atît la om cît şi la animale, a pus în evidenţă unele modificări care reflectă şi intensificarea permeabilităţii tisulare [3]. Deşi membrana celulară este considerată radiorezistentă [4], există o serie de date cu privire la creşterea permeabilităţii ei în urma iradierii celulelor izolate : pierderea nicotinadenindinucleotidului (NAD) de către celulele ascitice Ehrlich [5]—[7], efluxul accentuat de potasiu [1], liza reticulocitelor [8] etc.

Pe baza acestor considerente ne-am propus investigarea efectului radiaţiilor X asupra diferitelor mecanisme de transfer prin membrana celulelor izolate : difuzia, respectiv transportul activ, legat de metabolismul energetic. Am utilizat în acest scop metionina marcată cu ^{75}Se, care în urma activităţii sale gama poate fi măsurată în condiţii tehnice relativ simple.

MATERIAL ŞI METODĂ

Celulele ascitice Ehrlich, prelevate de la şoareci albi la 10 zile după inoculare şi spălate după tehnicile uzuale, au fost resuspendate în cîţiva ml de tampon fosfat Krebs-Ringer, lipsit de Ca^{2+} (pH = 7,4]. Suspensia de celule a fost iradiată cu raze X în doze de 500—1000—5 000 R — filtru 0,5 Al + 0,5 Cu, 10 mA, 180 kV, 375 R/min. În decurs de o oră după iradiere, celulele au fost suspendate în acelaşi tampon, 3 g la 100 ml. Transportul metioninei marcate cu ^{75}Se-selenometionină

a fost investigat, în principiu, după metoda descrisă de Johnstone [9], în următoarele condiţii :

Influx : 12 ml suspensie celulară s-au incubat la 37° C cu 2 mM (concentraţie finală) de metionină, marcată cu ^{75}Se-selenometionină (Amersham, aproximativ 2 microCurie, 1,2 milioane impulsuri pe minut). La intervale de 1—4—7 minute s-au prelevat cîte 2 ml suspensie celulară, în 6 ml tampon răcit la 4° C, centrifugîndu-se rapid timp de 2 minute. După îndepărtarea minuţioasă a supernatantului, radioactivitatea din celule a fost determinată într-un cristal cu puţ (GAMMA) de 50 × 50 mm. Radioactivitatea proteinelor s-a determinat în aceleaşi condiţii geometrice după precipitare cu acid tricloracetic (concentraţia finală 10%) şi trei spălări. Diferenţa celor două măsurători corespunde radioactivităţii metioninei libere din celule.

Difuzia prin schimb (*exchange diffusion*) : 12 ml suspensie celulară s-au preincubat la 37° C timp de 30 min cu metionină nemarcată, în concentraţie finală de 2 mM. După îndepărtarea supernatantului, celulele au fost incubate la 37° C cu metionină marcată cu ^{75}Se, în condiţiile amintite. Tratare ulterioară ca mai sus.

Rezultatele se referă la cîte 4 probe paralele şi au fost prelucrate statistic prin analiza varianţei [10].

REZULTATE

Influxul metioninei în celule este în general stimulat în urma iradierii cu raze X. Dozele mai mici de radiaţii sînt mai eficiente (tab. 1). Diferenţele faţă de martori cresc cu timpul, reflectînd probabil influenţa iradierii asupra transportului activ.

Tabela 1

Efectul radiaţiei X asupra influxului metioninei marcate cu ^{75}Se-selenometionină-exprimată în impulsuri pe minut – în celulele tumorale ascitice Ehrlich (valori medii din 4 repetiţii)

Timpul de incubare în min	Martor	500 R	1000R	5000R	Diferenţa între loturile					
					500R-Martor	1000R) Martor	5000R-Martor	500R – 1000R	500R 5000R	1000R – 5000R
1	2418	3120	2902	2715	702[3])	484[2])	297	218	405[1])	187
4	4242	5380	5245	4948	1138[3])	1003[3])	706[3])	135	432[2])	297
7	5700	7170	6840	6755	1470[3])	1140[3])	1055[3])	330[1])	415[1])	85

1) $DL_{0.05}$: 318
2) $DL_{0.01}$: 429
3) $DL_{0.001}$: 572

Difuzia prin schimb a metioninei în celule este de asemenea stimulată sub influenţa iradierii (tab. 2). Diferenţele faţă de martori sînt în primul minut mai accentuate la dozele mai mari (lotul 5000 R crescut faţă de lotul 500 R). În etapa următoare, procesul de transfer se accelerează la lotul 500 R, întrecînd în minutul 7 valorile lotului 5 000 R. Lotul 1 000 R ocupă o poziţie intermediară.

Tabela 2

Efectul radiației X asupra difuziei prin schimb a metioninei marcate cu ^{75}Se-selenometionină – exprimată în impulsuri pe minut – în celulele tumorale ascitice Ehrlich (valori medii din 4 repetiții).

Timpul de incubare în min	Martor	500R	1000R	5000R	Diferența între loturile					
					500R – Martor	1000R – Martor	5000R – Martor	500R – 1000R	500R – 5000R	1000R – 5000R
1	8700	9380	9578	9932	680[3])	878[3])	1232[3])	−198	−552[2])	−354
4	10580	11415	10958	11768	835[3])	378[1])	1188[3])	457[1])	−353	−810[3])
7	10968	12470	11835	11868	1502[3])	867[3])	900[3])	635[2])	602[2])	− 33

1) $DL_{0.05}$: 363
2) $DL_{0.01}$: 490
3) $DL_{0.001}$: 653

DISCUȚII

Penetrarea substanțelor în celule este un proces foarte complex, legat de starea fizico-chimică a membranei, de prezența unor proteine specifice din membrană — determinate genetic — cu funcție de vehiculare [11], [12], precum și de o serie de procese metabolice generatoare de energie. Radiațiile X pot produce într-un stadiu precoce atît modificări în starea fizico-chimică a membranei, cît și alterări în structura acizilor dezoxiribonucleici [ADN], în conformația proteinelor enzimatice și a vehiculanților specifici [13], [14].

Difuzia prin schimb este considerată un proces de transport pasiv — în urma independenței sale de procesele metabolice — dar mediat de vehiculanți specifici [15]. Astfel, în stadiul ei inițial predomină probabil procesele pasive de permeabilitate, starea staționară fiind rezultanta acestui proces și a transportului activ.

Din datele noastre reiese că sub acțiunea iradierii celulelor ascitice Ehrlich se produce o intensificare a transportului metioninei prin membrana celulară, determinată probabil de intensificarea a două procese : difuzia pasivă, care crește mai pronunțat la doze mai mari (5000 R), și transportul activ, crescut mai accentuat la doze mai mici (500 R).

Creșterea permeabilității membranei celulare în urma iradierii este un fapt bine cunoscut și admis. Este însă greu de interpretat creșterea mai pronunțată a transportului activ sub influența dozelor mai mici. S-a descris, după iradierea unor specii de celule cu doze pînă la 400 R, creșterea activității adenozintrifosfatazice (ATP-azice), procesul de activare a enzimei ne mai putînd fi pus în evidență la doze mai mari [16], [17]. Pe lîngă acest efect variabil asupra activității ATP-azei, s-ar putea presupune și modificarea conformației — sub influența iradiației — și a altor proteine implicate prin intermediul metabolismului în procesul de transport activ.

În concluzie — fără a intra în speculații pe marginea rezultatelor obținute — se remarcă un efect multilateral al iradiației asupra unor procese biochimice corelate cu permeabilitatea celulară și transportul activ, acesta constituind obiectul unor cercetări viitoare.

Prezentat la redacție
la 5 februarie 1969

Catedra de radiologie
și Catedra de chimie biologică,
Institutul medico-farmaceutic, Tîrgu-Mureș

BIBLIOGRAFIE

1. V. VÁRTERÉSZ, *Sugárbiologia*, Ed. Medicina, Budapesta, 1963, Cap. III, p. 59.
2. L. WISH, J. FURTH, C. W. SHEPPARD, R. H. STOREY, Am. J. Roentgenol., **67**, 628 (1952).
3. G. M. KRISE, C. M. WILLIAMS, Am. J. Physiol., **196**, 1352. (1959).
4. W. BLOOM, Radiology **49**, 344 (1947).
5. H. HILZ, H. MAASE, F. HÖLZEL, A. HIRSCH-HOFFMANN, M. OLDEKOP, Bioch. Ztschr., **339**, 198 (1963).
6. H. Hilz, P. HLAVICA, B. BERTRAM, Bioch. Ztschr., **338**, 283 (1963).
7. H. HILZ, B. HUBMANN, M. OLDEKOP, M. SCHOLZ, M. v. GÖSSLER, Bioch. Ztschr., **336**, 62 (1962).
8. H. SHALL, F. TURBA, Bioch. Ztschr., **339**, 224 (1963).
9. R. M. JOHNSTONE, P. G. SCHOLEFIELD, Biochim. Biophys. Acta, **94**, 130 (1965).
10. H. SLUȘANSCHI, St. cerc. biochim., **8**, 345 (1965).
11. L. E. HOKIN, M. R. HOKIN, Ann. Rev. Biochem., **32**, 553 (1963).
12. J. J. GITS, M. GRENSON, Biochim. Biophys. Acta, **135**, 507 (1967).
13. M. G. ORD, L. A. STOCKEN, Biochim. Biophys. Acta, **37**, 352 (1960).
14. SHAN-MING-SUNG, Canad, J. Biochem., **43**, 859 (1965).
15. E. GILLESPIE, Biochim. Biophys. Acta, **135**, 1016 (1967).
16. G. ASHWELL, J. HICKMANN, Proc. Soc. exp. Biol., **80**, 407 (1952).
17. M. G. ORD, L. A. STOCKEN, Nature, **182**, 1787 (1958).

THE TRANSFER OF ^{75}SE-LABELLED METHIONINE IN X-RAY IRRADIATED EHRLICH ASCITES CARCINOMA CELLS

SUMMARY

Ehrlich ascites carcinoma cells, irradiated with 500—1 000—5 000 R, show an increase of methionine influx and exchange diffusion, as compared to the controls. The stimulation of methionine influx decreases with increasing irradiation doses, whereas the exchange diffusion stimulation is directly related to the dose. A differentiated irradiation effect on diffusion and active transport processes is suggested and the possible mechanisms are discussed.

ST. CERC. BIOCHIM., 12, 4, 345–354, 1969

UNELE ASPECTE BIOCHIMICE ALE PROCESULUI DE DIFERENȚIERE A MUGURILOR FLORALI LA CAIS

ELENA ILIESCU

Rezumat. — S-a urmărit activitatea catalazei, polifenoloxidazei și peroxidazei în frunze și mugurii vegetativi și florali și evoluția zaharurilor simple, a azotului total și proteic și a substanțelor oxidabile cu iod și permanganat de potasiu în frunze. S-au stabilit două momente la interval de aproximativ 30 de zile (I la 15–20 iulie și II la 15–20 august), în care oxidazele manifestă creșteri sau scăderi mari și bruște ale activității lor la pH 4,7 și 7,0 și cînd în frunze scade cantitatea de zaharuri și azot și crește cea a substanțelor cu potențial ridicat de oxidare. Primul moment ar corespunde pregătirii individualizării morfologice a mugurilor florali de cei vegetativi, cînd apar deosebiri în conul de creștere, iar al doilea — procesului de organogeneză masivă.

Problema formării mugurilor florali este una dintre cele mai însemnate probleme ale pomiculturii și a angajat numeroase lucrări, în special de biologie și morfologie. Numeroase lucrări asupra multor specii și grupe de substanțe arată că procesele morfogenetice sînt urmări ale unor schimbări precise ce se petrec în biochimismul celular [7]. S-au stabilit deosebiri chimice între mugurii floriferi și cei vegetativi, ca de exemplu un conținut mai ridicat de apă (4) sau un conținut mai mic de asparagină liberă [8] în mugurii floriferi. Studiile de morfologie au arătat că procesul de diferențiere a mugurilor florali durează 42–80 zile, înregistrînd cîteva perioade distincte : două-trei [9], sau patru [3] la cais, sau chiar opt la cireș [2].

Pentru găsirea unor corespondențe între etapele morfologice parcurse de diferențierea mugurilor florali și procesele biochimice ce le preced sau însoțesc, ne-am propus să studiem activitatea unor enzime implicate în procesele de oxido-reducere și conținutul unor substanțe cu rol important în metabolismul plantei.

Deoarece caisul se caracterizează prin 2 și 3 valuri de creștere distincte, iar diferențierea mugurilor florali pe lăstarii de creștere este net influențată ca durată și etape, de acestea [9], am considerat că mai indicate pentru studiu sînt formațiunile numite buchete, pentru a elimina, în parte, diferențele mari din metabolism datorite valurilor de creștere. Pe buchete creșterile stagnează, la un moment dat, ceea ce asigură o oarecare stabilitate metabolismului.

MATERIAL ŞI METODĂ

S-a lucrat pe cais din soiul „Cea mai bună de Ungaria", altoit pe mirobolan, dintr-o plantaţie tînără, la Bucureşti-Băneasa, în anii 1963 şi 1964. Ca material de studiu s-au folosit frunze şi muguri (vegetativi şi florali) din buchete de pe ramuri de un an, determinările efectuîndu-se începînd din perioada diferenţierii mugurilor pînă la căderea frunzelor şi intrarea în repausul de iarnă. Astfel, am considerat că procesul de diferenţiere a mugurilor florali poate fi caracterizat mai bine din punct de vedere biochimic. Probele s-au recoltat începînd din luna iulie, cînd nu sînt deosebiri morfologice între mugurii vegetativi şi cei floriferi. De la jumătatea lunii august, o dată cu individualizarea morfologică, mugurii florali depăşind în volum pe cei vegetativi, aceştia s-au analizat separat.

Determinările efectuate au fost următoarele : activitatea catalazei — gazometric [1] la 25° C ; activitatea polifenoloxidazei (Pf0) şi a peroxidazei (PO) titrimetric [6]; substanţele reducătoare totale după Hagedorn [1]; zaharurile simple după metoda Bertrand, modificată de Bierri [1]; azotatul total şi proteic după Kjeldahl-Barnstein [5]; oxidabilitatea cu iod şi permanganat de potasiu titrimetric (titrarea cu $KMnO_4$) cu indigocarmin drept indicator).

Pentru activitatea oxidazelor, extractele s-au făcut în tampon acetic cu pH 4,7 şi în apă cu $CaCO_3$ (0,5 g pentru 1 g material) (pH 7,0), în raportul de 1 : 20. La determinare s-a folosit suspensia ca atare, bine omogenizată, după un interval de maximum o oră de la preparare, păstrîndu-se riguros aceeaşi ordine şi timp, de-a lungul întregului studiu.

La recoltarea probelor s-au evitat zilele ploioase sau cele de după ploaie.

REZULTATE

Datele prezentate sînt cele obţinute în anul 1964.

Activitatea catalazei (fig. 1) arată, în general, o variaţie relativ mică, crescînd uşor — în frunze — pînă la sfîrşitul lunii august, după care scade continuu. În mugurii vegetativi şi florali ea variază paralel, fiind uşor superioară în cei vegetativi. Variaţia este aproximativ inversă celei din frunze, activitatea crescînd uşor şi continuu, din luna septembrie pînă la intrarea în repausul de iarnă.

Activitatea oxidazelor arată variaţii mult mai pronunţate, care se corelează cu variaţiile altor componente. În frunze (fig. 2), polifenoloxidaza (PfO) este tot timpul mai activă la pH 7,0, iar în muguri la pH 4,7. Excepţie face momentul — clar exprimat astfel — de la începutul decadei a treia a lunii iulie, cînd situaţia este inversă, atît calitativ (pH), cît şi cantitativ : în frunze activitatea PfO scade brusc, pe cînd în muguri ea creşte la fel de brusc (aproape de 4 ori). După acest moment, în frunze activitatea se menţine constantă la pH 4,7, prezentînd încă un minim — dar mai mic — la jumătatea lunii august. Acest al doilea moment are corespondent şi în muguri (fig. 3) : acelaşi minim al $PfO_{4,7}$, cu un maxim pentru $PfO_{7,0}$,

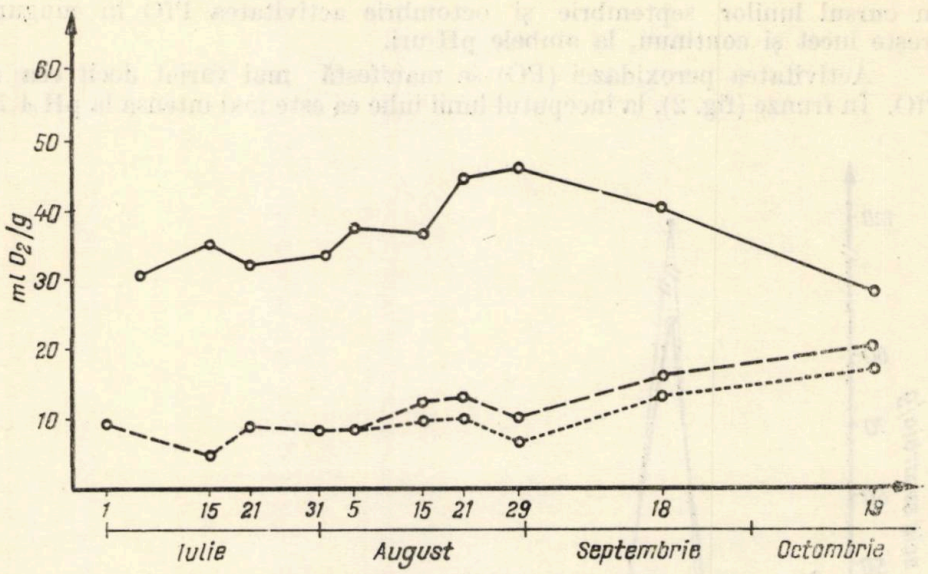


Fig. 1. — Activitatea catalazei în frunze şi muguri

——— frunze
– – – muguri vegetativi
-------- muguri floriferi

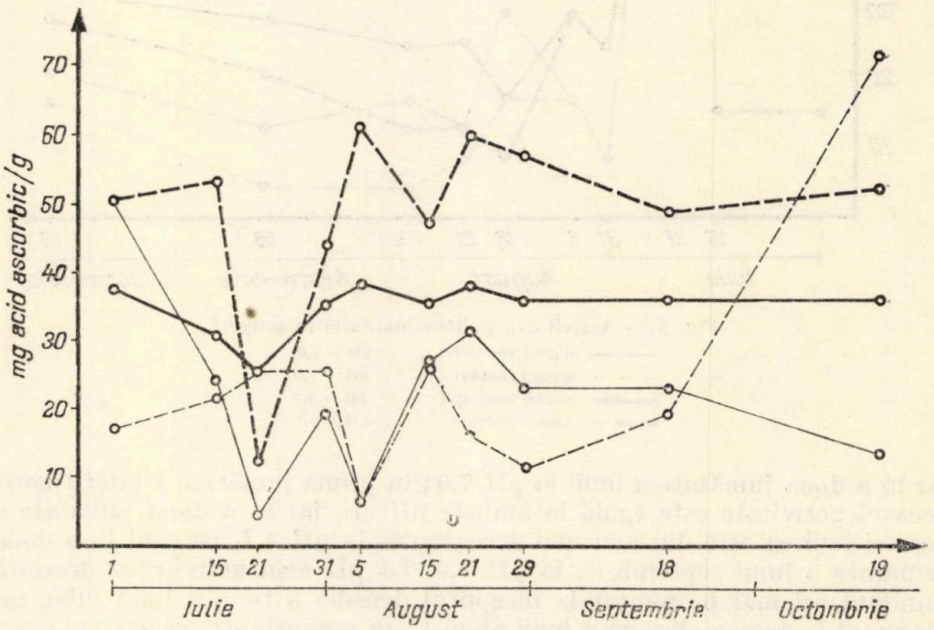


Fig. 2. — Activitatea polifenoloxidazei şi peroxidazei în frunze

——— muguri vegetativi pH = 7,0
muguri vegetativi pH = 4,7
– – – muguri floriferi pH = 7,0
muguri floriferi pH = 4,7

În cursul lunilor septembrie şi octombrie activitatea PfO în muguri creşte încet şi continuu, la ambele pH-uri.

Activitatea peroxidazei (PO) se manifestă mai variat decît cea a PfO. În frunze (fig. 2), la începutul lunii iulie ea este mai intensă la pH 4,7,

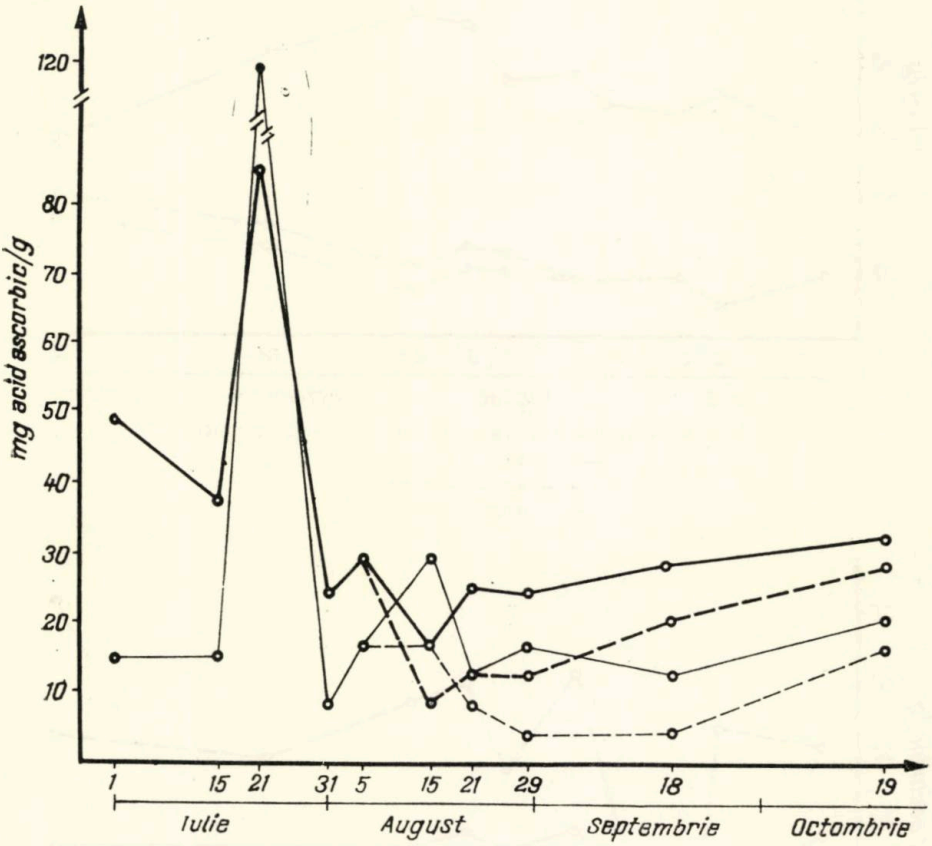


Fig. 3. — Activitatea polifenoloxidazei în muguri

———	muguri vegetativi	pH = 7,0
– – –	muguri floriferi	pH = 7,0
▬▬▬	muguri vegetativi	pH = 4,7
▬ ▬ ▬	muguri floriferi	pH = 4,7

iar în a doua jumătate a lunii la pH 7,0 ; în prima jumătate a lunii august această activitate este egală la ambele pH-uri, iar în a doua jumătate a acestei luni ea este din nou mai accentuată, la pH 4,7, pe cînd în a doua jumătate a lunii septembrie, la pH 7,0. La pH acid activitatea prezintă minimul cel mai pronunţat la începutul decadei a treia a lunii iulie, iar maximul la aceeaşi decadă a lunii august. În muguri, atît vegetativi cît şi florali (fig. 4), activitatea PO este sensibil mai mare la pH 7,0 începînd din a doua jumătate a lunii august. Se deosebesc două maxime, la aceleaşi date din iulie şi august, însă la cel din august mugurii florali depăşesc de aproape 3 ori pe cei vegetativi.

Conținutul substanțelor oxidabile în frunze (fig. 5) constituie și el un indiciu al stării fiziologice a celulei. Se remarcă faptul că oxidabilitatea cu iod (potențial de oxidare mai mic) nu suferă schimbări însemnate de-a lungul perioadei cercetate; oxidabilitatea cu permanganat de potasiu

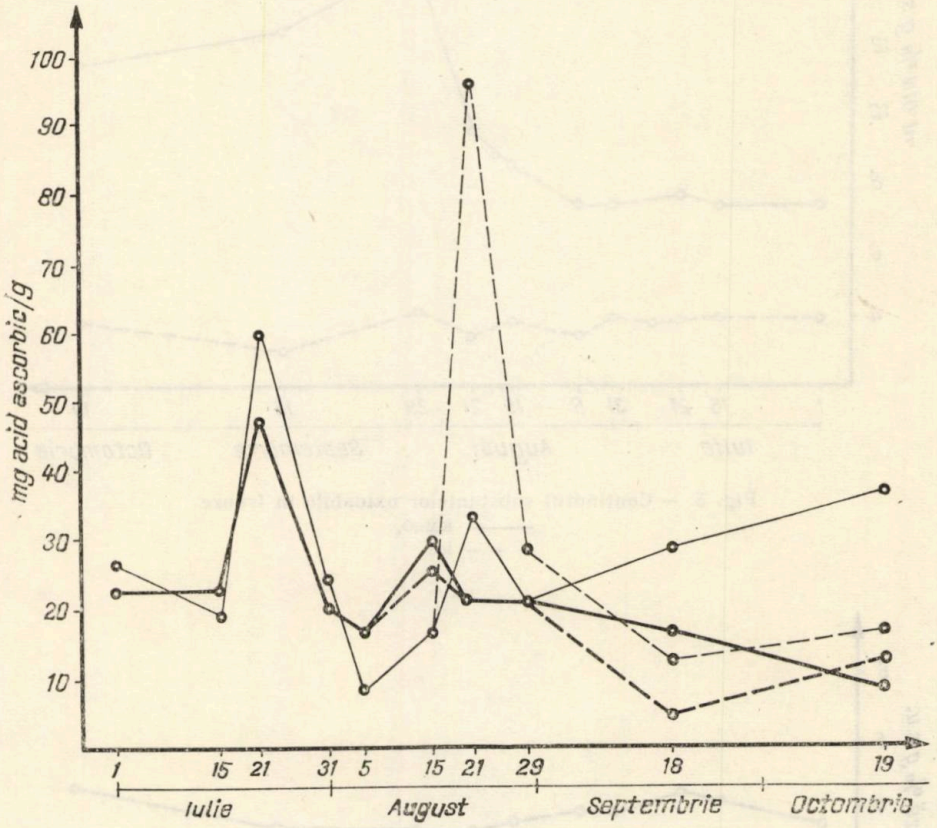


Fig. 4. — Activitatea peroxidazei în muguri

——— muguri vegetativi pH = 7,0
– – – muguri floriferi pH = 7,0
——— muguri vegetativi pH = 4,7
▬ ▬ ▬ muguri floriferi pH = 4,7

(potențial de oxidare mai ridicat) arată însă o creștere în cursul lunii august, atingînd dublul la sfîrșitul acestei luni.

Substanțele reducătoare totale (fig. 6) arată variații cantitative relativ mici, marcîndu-se un ușor maxim la începutul decadei a treia a lunii iulie, o ușoară depresiune în cursul lunii august și apoi din nou o creștere pînă la căderea frunzelor. Dar dacă din acestea deosebim zaharurile reducătoare simple, se observă variații mult mai evidente, care sînt oarecum inverse variațiilor substanțelor reducătoare nezaharate, ceea ce explică aspectul curbei sumei lor. Conținutul de zaharuri prezintă două

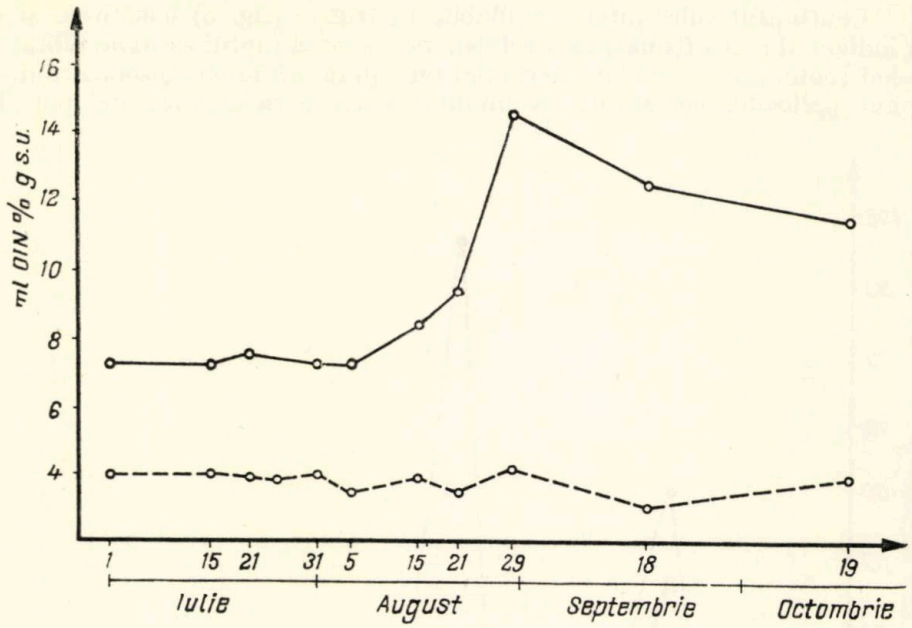


Fig. 5. — Conținutul substanțelor oxidabile în frunze
——— $KMnO_4$
– – – iod

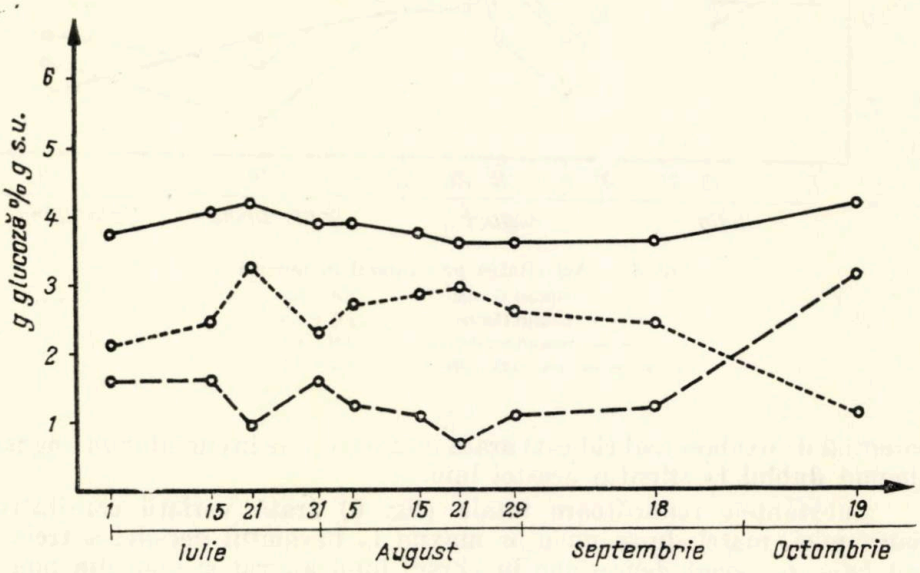


Fig. 6. — Conținutul substanțelor reducătoare în frunze
——— substanțe reducătoare (Hagedorn)
– – – zaharuri reducătoare (Bierri)
– – – substanțe reducătoare nezaharate

minime distincte tot în decada a treia a lunilor iulie și august, ceea ce denotă un consum mărit în cadrul metabolismului plantei.

În ce privește conținutul azotului în frunze (fig. 7), element al unei grupe însemnate de substanțe plastice, se observă variații ce se corelează

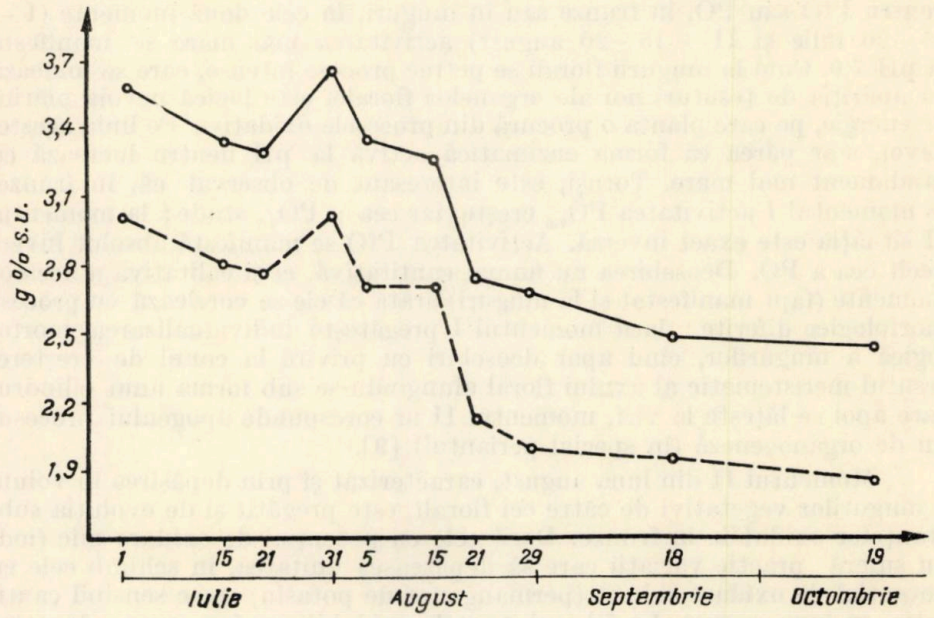


Fig. 7. — Conținutul de azot în frunze
——— azot total
– – – azot proteic

la fel de bine cu cele două metode marcate de celelalte elemente. Curbele azotului total și proteic sînt aproximativ paralele și manifestă o scădere vizibilă în decada a treia a lunilor iulie și august.

DISCUȚII

Variațiile activității enzimelor și ale conținutului în substanțe plastice desemnează unele momente deosebite în metabolismul plantei, corespunzătoare — desigur — unor etape distincte ale biologiei acesteia. Foarte bine se conturează două momente: începutul decadei a treia a lunilor iulie (I) și august (II), la un interval de aproximativ 30 de zile.

Activitatea catalazei, enzimă finală în procesul de respirație, nu arată schimbări mari și bruște nici în frunze, nici în muguri, ceea ce denotă că ea nu este implicată în principal în procesele oxidative.

În schimb, activitatea oxidazelor arată deosebiri marcante sub mai multe aspecte. În primul rînd, se observă că în frunze PfO are pH-ul optim neutru (7,0), iar în muguri — acid [4], [7]. Cealaltă oxidază, PO,

atît în frunze cît și în muguri, are pH-ul optim cînd la o valoare, cînd la alta, în perioade diferite. Este vorba, probabil, de prezența diferitelor forme ale enzimelor — izoenzime —, cu proprietăți ușor diferite (exceptînd specificitatea reacției), care apar sau dispar în funcție de necesitățile metabolismului plantei. Este de reținut însă că oricare ar fi pH-ul optim pentru PfO sau PO, în frunze sau în muguri, în cele două momente (I — 15—20 iulie și II — 15—20 august) activitatea mai mare se manifestă la pH 7,0. Cum la mugurii florali se petrec procese intense, care se soldează cu apariția de țesuturi noi ale organelor florale, este logică nevoia mărită de energie, pe care planta o procură din procesele oxidative. Pe linia acestei nevoi, s-ar părea că forma enzimatică activă la pH neutru lucrează cu randament mai mare. Totuși, este interesant de observat că, în frunze, la momentul I activitatea $PO_{7,0}$ crește, iar cea a $PO_{4,7}$ scade; la momentul II situația este exact inversă. Activitatea PfO se manifestă absolut invers decît cea a PO. Deosebirea nu numai cantitativă, ci și calitativă a acestor momente (fapt manifestat și la muguri) arată că ele se corelează cu procese morfologice diferite: dacă momentul I pregătește individualizarea morfologică a mugurilor, cînd apar deosebiri cu privire la conul de creștere, țesutul meristematic al axului floral alungindu-se sub forma unui cilindru, care apoi se lățește la vîrf, momentul II ar corespunde apogeului procesului de organogeneză (în special periantul) [9].

Momentul II din luna august, caracterizat și prin depășirea în volum a mugurilor vegetativi de către cei florali, este pregătit și de evoluția substanțelor oxidabile în frunze. Dacă cele cu potențial de oxidare mic (iod) nu suferă practic variații care să depășească unitatea, în schimb cele cu potențial de oxidare ridicat (permanganat de potasiu) cresc sensibil cantitativ, în luna august. La fel, substanțele oxidabile cu fericianura de potasiu (calculate ca zahăr, prin metoda Hagedorn) arată maxime în cele două momente — mai mare în primul și mai mic în al doilea. Aceste substanțe reducătoare trebuie să intervină în procese exergonice eliberatoare de multă energie, necesară sintezei noilor țesuturi din mugurii florali. În același timp, cantitatea de zaharuri reducătoare implicate direct în procesul de respirație scade în frunze, ceea ce s-ar putea explica prin migrarea lor mai intensă de la locul de sinteză către muguri. Pentru această explicație ar pleda și creșterea ușoară a activității catalazei în muguri, în urma unei respirații mai intense, în momentele I și II. De altfel, în muguri nici nu poate avea loc o sinteză clorofiliană propriu-zisă, ei fiind acoperiți de solzi. Singura sursă de zaharuri sînt frunzele. Creșterea ulterioară a cantității de zaharuri în frunze, pînă la căderea lor, nu pare să se datoreze atît sintezei lor (care scade pe măsura îmbătrînirii frunzei), cît scăderii consumului lor, cum arată și scăderea activității catalazei.

Aceeași transportare de substanțe plastice din frunze în muguri o atestă și variația conținutului de azot, atît total cît și proteic: scăderea lui în frunze, în momentele desemnate din iulie și august, cînd probabil este mobilizat pentru noile sinteze din mugurii florali. Creșterea cantității de azot în frunze, ce urmează primei scăderi, însemnează restabilirea nivelului acestuia prin absorbție radiculară. Scăderea din perioada septembrie-octombrie se datorește, desigur, retragerii lui treptate în țesuturile lemnoase, unde se depune ca rezervă. Noi nu am avut posibilitatea să corelăm

cercetările noastre biochimice cu cercetări morfologice din aceiași ani. Dar stabilitatea proceselor morfologice, destul de puțin influențate de condițiile climatice anuale, credem că îngăduie corelarea preconizată de noi.

CONCLUZII

Cercetările biochimice asupra mugurilor și frunzelor au scos în evidență două momente bine conturate, la interval de aproximativ 30 de zile (I la 15—20 iulie și II la 15—20 august), momente ce se caracterizează printr-o activitate metabolică deosebit de intensă în aceste organe. Faptul este atestat de o ușoară scădere a activității catalazei în frunze și creșterea ei în muguri; de scăderea activității $Pf_{7.0}$ și a $PO_{4,7}$ (I) și creșterea $PfO_{7.0}$ și a $PO_{4.7.7.0}$ (II) în frunze; de creșterea bruscă și foarte mare a activității $PfO_{7.0.4.7}$ în muguri (I); de creșterea simțitoare a activității $PO_{7.0.4.7}$ (I) în muguri și a $Pf_{7.0}$ (II) în mugurii florali; de creșterea conținutului de substanțe cu potențial de oxidare ridicat (II) și de scăderea zaharurilor simple (I și II) și a azotului total și proteic (I și II) în frunze.

Primul moment ar corespunde pregătirii individualizării morfologice a mugurilor florali de cei vegetativi, cînd apar deosebiri în conul de creștere, iar al doilea — procesului de organogeneză masivă (în special periantul).

Prezentat la redacție
la 27 februarie 1969

Institutul central de cercetări agricole
Stațiunea experimentală pomicolă
Voinești-Dîmbovița

BIBLIOGRAFIE

1 Belozerski A., Proskuriakov I., *Prakticeskie rukovodstvo po biohimii rastenii*, Gosud. izd. selkohoz. lit., Moskva, 1951.
2. Bojkov D., Hristova J., Izv. nauč., izsled. Inst. Ovoštarstvo, Kostinbrod, **2**, 5 (1962).
3. Cojeneanu N., Lucr. șt. Inst. Agr., Iași, 259 (1958).
4. Cojeneanu N., St. cerc. Biol. șt. Agric., Acad. R.P.R., Iași, **10**, 275 (1959).
5. Ermakov A. I. ș.a., *Metodi biohimiceskogo issledovenia rastenii*, Gosud. izd. selkohoz. lit., Moskva, 1952.
6. Mihlin D., Bronoviţkaia A., Biohim., **14**, 379 (1949).
7. Nickerson W. J., Bartnicki-Garcia S., Ann. Rev. Plant Physiol., **15**, 327 (1964).
8. Sahulka J., Biol. Plant., Prague, **4**, 276 (1962).
9. Tarnavschi I. ș.a., Lucr. Grăd. Bot., București, I, 343 (1961—1962).

SOME BIOCHEMICAL ASPECTS OF THE DIFFERENTIATION OF APRICOT FLORAL BUDS

SUMMARY

Catalase, polyphenol oxidase and peroxidase activities both in leaves and vegetative and floral buds have been studied as well as the evolution of simple sugars, total and proteic nitrogen, iodine and $KMnO_4$ oxidabilities in leaves.

Two moments have been established at an interval of about 30 days (I on July 15—20 and II on August 15—20), when oxidase activities exhibit great and sudden increases or decreases at pH 4.7 and 7.0, lower sugar and nitrogen contents, and higher amounts of substances with high potential of oxidation .

The first moment would correspond to the preparation of morphological individualization of floral and vegetative buds, when differences in the growing tip occur ; the second one would correspond to the highest organogenesis.

ST. CERC. BIOCHIM., 12, 4, 355–365 (1969)

CROMATOGRAFIA PROTEINELOR SARCOPLASMATICE ŞI LOCALIZAREA RIBONUCLEAZELOR DIN MUŞCHIUL SARTORIUS DE BROASCĂ

CORINA IORDACHE

Rezumat. — S-a cercetat, cu ajutorul metodei cromatografiei pe DEAE-celuloză, fracţionarea proteinelor sarcoplasmatice din muşchiul sartorius de broască şi s-a determinat localizarea RN-azelor pe fracţiunile obţinute.

S-a constatat heterogenitatea avansată a acestor proteine care, prin cromatografiere, s-au separat în 10—12 fracţiuni proteice. Rezultatele obţinute indică o anumită corespondenţă biochimică între gradul lor de heterogenitate şi tipul histofiziologic al muşchiului.

Ribonucleazele cu pH optim în domeniul „acid" (4,0 şi 6,0) se localizează cu precădere pe primele fracţiuni proteice (II, IV), iar cele cu pH optim „neutru" (7,0) se localizează de preferinţă pe fracţiunile proteice care se eluează mai lent (V, IX).

Unele ţesuturi animale, cum sînt pancreasul, splina, ficatul, rinichiul etc., cu un conţinut relativ mare de acizi nucleici, manifestă şi o intensă activitate ribonucleazică (RN-azică), iar cercetările referitoare la identificarea, specificitatea, localizarea, natura şi numărul enzimelor de degradare a acizilor nucleici în asemenea ţesuturi sînt numeroase.

Ţesutul muscular, dimpotrivă, are un conţinut redus în acizi nucleici [1], iar activitatea lui RN-azică este mult mai slabă. Pentru aceste motive, studierea unor aspecte ca cele menţionate mai sus nu a prezentat suficient interes şi, în consecinţă, există puţine lucrări în acest domeniu. Referindune în special la activitatea RN-azică a muşchilor, menţionăm că Ellem, Colter şi Kuhn [2] au ajuns la concluzia că muşchii scheletici şi miocardul de şoarece posedă o activitate RN-azică practic neglijabilă, Roth şi colab. [3] au pus în evidenţă prezenţa acestei enzime la muşchii de şobolan, iar Epstein [4], la cei de iepure normal şi distrofic. Recent, Meyer şi Miller [5] au comunicat existenţa unei RN-aze intracelulare în muşchiul de iepure.

Într-o lucrare anterioară [6] am arătat că muşchiul sartorius de broască posedă trei RN-aze, şi anume două „acide" (pH = 4,0 şi 6,0) şi una „neutră" (pH = 7,0), spre deosebire de muşchii animalelor cu sînge cald, care au o RN-ază „acidă" şi una „alcalină". Existenţa celor trei RN-aze a fost confirmată şi prin calculele privind coeficientul de temperatură $(Q)_{10}$ şi energia de activare (E) pentru cele trei valori de pH [6].

Deoarece, în cazul țesutului muscular, enzimele intră în compoziția proteinelor sarcoplasmatice, ne-am propus să cercetăm localizarea ribonucleazelor pe fracțiunile obținute prin cromatografiere. În lucrarea de față se expun datele experimentale obținute în această direcție și care constituie noi contribuții la cunoașterea proprietăților fizico-chimice și enzimatice ale proteinelor sarcoplasmatice din mușchi. Menționăm că în literatură nu am găsit date privind localizarea RN-azelor pe proteinele sarcoplasmatice din mușchi, lucrările fiind orientate, în special, spre cercetarea localizării enzimelor glicolitice [7]—[11].

MATERIAL ȘI METODE

S-au folosit mușchi sartorius proveniți de la broaște (*Rana ridibunda*) cărora li s-a distrus măduva spinării cu 2—3 ore înainte de izolarea lor. Mușchii s-au disecat cu atenție, pentru evitarea oricărei lezări, s-au spălat în soluție fiziologică și s-au uscat ușor, pe hîrtie de filtru.

Extracția proteinelor sarcoplasmatice s-a făcut din 20—30 perechi de mușchi, mărunțiți și mojarați la rece, cu tampon Tris (5.10^{-3}M), pH 7,6, timp de o oră (+ 4°C), raportul de extracție fiind de 2 volume tampon la o parte greutate mușchi. Omogenatul astfel obținut s-a centrifugat 40 min la 15000 t/min (+ 4°C). Soluția proteică limpede s-a utilizat apoi pentru cromatografiere. Concentrația proteică s-a determinat prin metoda biuretului și a variat între 19—21 mg/ml.

Cromatografia pe dietilaminoetilceluloză (DEAE-SS Serva) s-a efectuat folosind o coloană de 17/1,5 cm, echilibrată cu tampon Tris 5.10^{-3}M. Cantitatea de proteină introdusă în coloană a fost cuprinsă între 50 și 100 mg. Eluția fracțiunilor proteice s-a făcut la temperatura camerei (+ 18°C), în tampon Tris 5.10^{-3}M, pH 7,6, în gradient continuu de concentrație de NaCl, cuprins între 0 și 2M. S-au colectat probe de cîte 3 ml, debitul de eluție fiind de 25 ml/oră. Diagramele de fracționare s-au stabilit prin spectrofotometrie la 280 mμ.

Concentrarea și purificarea ribonucleazei din extractul muscular brut s-a făcut luîndu-se în considerare faptul că această enzimă se găsește în fracțiunea insolubilă la 80% saturare cu sulfat de amoniu [12].

Determinarea activității ribonucleazice a extractelor inițiale brute, a celor purificate prin salifiere cu sulfat de amoniu, ca și a fracțiunilor rezultate din cromatografierea pe coloană, s-a făcut după metoda expusă în lucrarea noastră anterioară [6]. Absorbția oligonucleotidelor acido-solubile s-a determinat spectrofotometric la 260 mμ. Ca unitate RN-azică s-a definit cantitatea de enzimă care, în condițiile noastre de lucru (la 37°C, timp de 2 ore), a modificat absorbția cu 0,1.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

În figura 1 este dată, spre exemplificare, o diagramă de separare a proteinelor sarcoplasmatice din mușchiul sartorius de broască. După cum se observă din examinarea acestei figuri, în condițiile noastre de lucru, aceste proteine musculare se separă în circa 10—12 fracțiuni proteice.

În linii mari, această fracţionare este asemănătoare cu cea obţinută de Şerban şi Tănăsescu [13] în cazul proteinelor sarcoplasmatice din muşchiul gastrocnemian de broască, evidenţiindu-se încă o dată gradul mare de heterogenitate al proteinelor musculare de acest tip.

Comună atît muşchiului sartorius cît şi celui gastrocnemian sau celui neted este rapiditatea cu care se eluează fracţiunea I, nereţinută

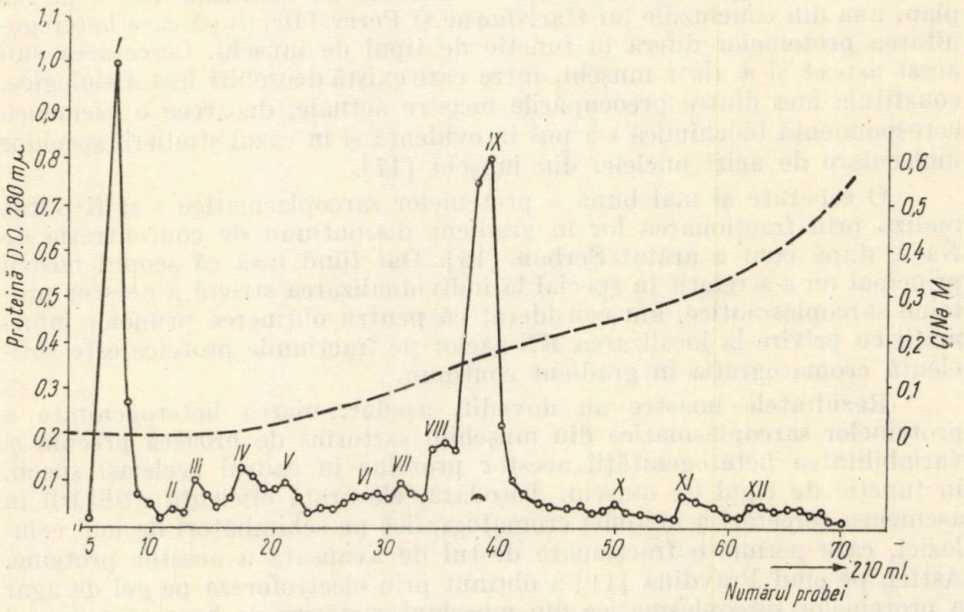


Fig. 1. — Fracţionarea pe DEAE-celuloză a proteinelor din muşchiul sartorius de broască.
——— determinări spectrofotometrice (280 ,mμ);
— — — gradientul de concentraţie.

de suportul DEAE-celulozic. Spre deosebire însă de spectrul obţinut la muşchiul gastrocnemian sau la cel neted, unde la separare reies 4—5 fracţiuni majore, proteinele sarcoplasmatice din muşchiul sartorius de broască prezintă doar două fracţiuni majore, I şi IX. Pe cînd la cromatografierea proteinelor sarcoplasmatice din muşchiul gastrocnemian fracţiunile I, IV, V şi VI apar între 0 şi 0,2 M concentraţie în clorură de sodiu, în cazul proteinelor din muşchiul sartorius apar în acelaşi interval numai fracţiunile majore I şi IX. Celelalte fracţiuni apar la un gradient de concentraţie cuprins între 0,2 şi 0,5 M NaCl.

Această deosebire dintre curbele de fracţionare pe coloană de DEAE-celuloză a proteinelor sarcoplasmatice din cei doi muşchi striaţi — muşchiul sartorius şi cel gastrocnemian — reflectă, probabil, pe plan biochimic, unele deosebiri de ordin histofiziologic dintre ei. Se ştie că muşchiul sartorius face parte din categoria muşchilor striaţi atonici, pe cînd cel gastrocnemian face parte din categoria muşchilor striaţi tonici [14]. În acest sens menţionăm şi lucrarea lui Kadîkov şi colab. [15] care, studiind electroforetic fracţiunile proteice din sarcoplasma diferiţilor muşchi, au ajuns la concluzia că în cazul ţesutului muscular cu o reacţie tetanică mai

evidentă apar mai puţine fracţiuni cu migrare rapidă şi mai multe fracţiuni cu migrare lentă.

Diferenţierea semnalată de noi între cei doi muşchi comparaţi în ce priveşte numărul de fracţiuni majore şi amplasarea acestora la separarea proteinelor sarcoplasmatice permite să se deducă existenţa unei anumite corespondenţe biochimice între gradul de heterogenitate al acestor proteine şi tipul histofiziologic de muşchi. Se confirmă astfel, pe alt plan, una din concluziile lui Hartshorne şi Perry [16] după care heterogenitatea proteinelor diferă în funcţie de tipul de muşchi. Cercetarea sub acest aspect şi a altor muşchi, între care există deosebiri histofiziologice, constituie una dintre preocupările noastre actuale, deoarece o asemenea corespondenţă biochimică s-a pus în evidenţă şi în cazul studierii speciilor moleculare de acizi nucleici din muşchi [17].

O separare şi mai bună a proteinelor sarcoplasmatice s-ar fi putut realiza prin fracţionarea lor în gradient discontinuu de concentraţie de NaCl, după cum a arătat Şerban [18]. Dat fiind însă că scopul nostru principal nu s-a referit în special la individualizarea strictă a acestor proteine sarcoplasmatice, am considerat că pentru obţinerea primelor informaţii cu privire la localizarea RN-azelor pe fracţiunile proteice este suficientă cromatografia în gradient continuu.

Rezultatele noastre au dovedit, aşadar, marea heterogenitate a proteinelor sarcoplasmatice din muşchiul sartorius de broască precum şi variabilitatea heterogenităţii acestor proteine în cadrul aceleiaşi specii, în funcţie de tipul de muşchi. Totodată, ele arată eficienţa utilizării în asemenea cercetări a metodei cromatografice pe schimbători de ioni celulozici, care permit o fracţionare destul de avansată a acestor proteine. Astfel, pe cînd Pravdina [11] a obţinut prin electroforeza pe gel de agar a proteinelor sarcoplasmatice din muşchiul sartorius de broască numai 6 fracţiuni, noi am obţinut pe DEAE-celuloză un număr de fracţiuni aproape dublu (10—12 fracţiuni).

Pentru a caracteriza din punct de vedere al activităţii lor RN-azice proteinele sarcoplasmatice separate pe coloană în modul arătat mai sus, am examinat capacitatea fiecărei fracţiuni obţinute de a scinda ARN-ul folosit ca substrat. Deoarece în lucrarea anterioară [6] am arătat că muşchiul sartorius de broască posedă trei RN-aze, cu pH optim = 4,0; 6,0 şi 7,0, determinările de activitate s-au făcut pentru toate aceste trei valori de pH. Am constatat că fracţiunile eluate de pe coloana de DEAE-celuloză prezintă o activitate RN-azică atît de redusă, încît valorile obţinute nu ne-au permis aprecieri cantitative satisfăcătoare.

De aceea, am considerat necesară concentrarea şi purificarea extractului brut, iniţial, astfel încît prin procesul de fracţionare pe coloană să se obţină eluate dotate cu o activitate enzimatică suficientă unor determinări cantitative. De obicei, în lucrările de acest gen se foloseşte, în principiu, procedeul de salifiere a extractelor cu sulfat de amoniu, dat de Kunitz [12], [19], [20]. Am recurs şi noi la o schemă de lucru asemănătoare, şi anume :

Etapa I : fracţionare cu $(NH_4)_2SO_4$; s-a adăogat extractului brut, în porţiuni mici, $(NH_4)_2SO_4$ solid, sub agitare continuă, pînă la o saturare de 60%, iar precipitatul format a fost separat de soluţie prin filtrare.

Etapa II : la filtratul din etapa I s-a adăogat în continuare, în porţiuni mici, sub agitare continuă, $(NH_4)_2SO_4$ solid, pînă la o saturare de 80%, iar amestecul de precipitat + soluţie a fost lăsat la frigider 48 ore, agitîndu-se din cînd în cînd.

Etapa III : precipitatul din etapa II, care conţine RN-aza, s-a separat de soluţie prin centrifugare, 20 min la 5500 t/min (+ 4°C), apoi s-a solvit în 2-3 ml tampon Tris 5.10^{-3}M, iar soluţia astfel obţinută s-a supus dializei faţă de acelaşi tampon, timp de 48 ore, tamponul de dializă schimbîndu-se de 4-5 ori.

Schema de lucru, exemplificată cu datele noastre experimentale, este redată în tabela 1.

Tabela 1

Concentrarea şi purificarea extractului de proteine sarcoplasmatice din muşchiul sartorius de broască

Etapa de purificare	Volum (ml)	Unităţi RN-ază/ml			Proteina (g%)
		pH = 4,0	pH = 6,0	pH = 7,0	
1. Extract brut	29	359	133	93	1,95
2. Precipitatul de la 60% saturare cu $(NH_4)_2SO_4$ după solvire şi dializă	11	75	59	57	1,12
3. Precipitatul de la 80% saturare cu $(NH_4)_2SO_4$ după solvire şi dializă	8,6	64	88	56	1,02
4. Supernatantul de la 80% saturare cu $(NH_4)_2SO_4$, după dializă	27,4	22	27	82	sub 0,05

După cum se observă din examinarea valorilor redate în tabela 1, această schemă nu este satisfăcătoare în cazul extractului muscular, deoarece o bună parte din enzimă rămîne fixată pe proteinele care se separă în precipitatul din etapa I (60% saturare cu $(NH_4)_2SO_4$).

De aceea, am recurs la o singură prelucrare a extractului cu $(NH_4)_2SO_4$, pînă la 90% saturare. Schema de lucru, exemplificată cu datele noastre experimentale, este redată în tabela 2.

Tabela 2

Concentrarea şi purificarea extractului de proteine sarcoplasmatice din muşchiul sartorius de broască

Etapa de purificare	Volum (ml)	Unităţi RN-ază/ml			Proteină (g%)
		pH = 4,0	pH = 6,0	pH = 7,0	
1. Extract brut	26	313	294	214	2,20
2. Precipitatul de la 90% saturare cu $(NH_4)_2SO_4$ după solvire şi dializă	20	170	198	148	1,45
3. Supernatantul de la 90% saturare cu $(NH_4)_2SO_4$ după dializă	25	67	62	64	0,22

După cum arată valorile înscrise în această tabelă, salifierea extractului cu $(NH_4)_2SO_4$ pînă la 90% saturare permite obținerea unui preparat care conține peste 70% din activitatea inițială a extractului.

Cromatografia unui astfel de preparat proteic este exemplificată în figura 2.

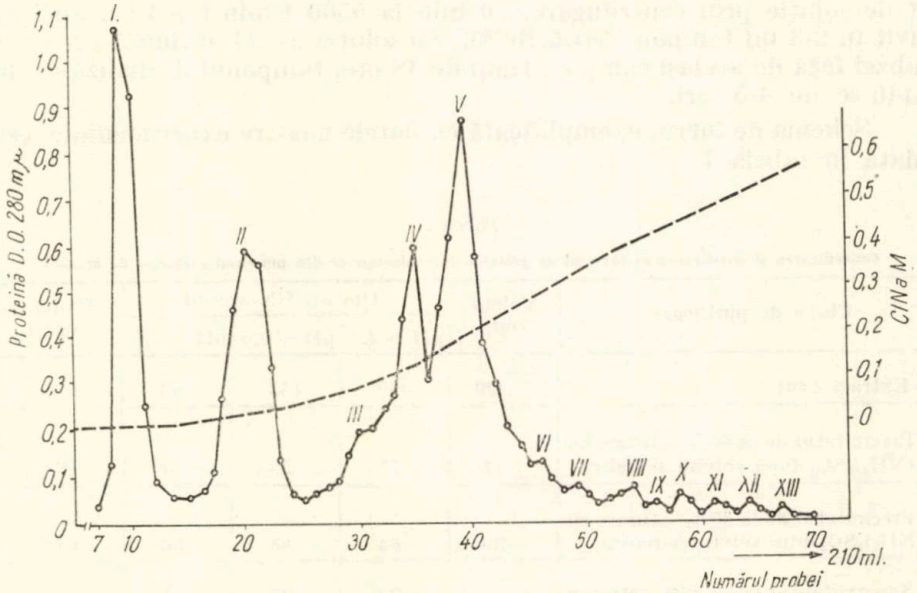


Fig. 2. — Fracționarea pe DEAE-celuloză a proteinelor din mușchiul sartorius de broască, după salifierea cu $(NH_4)_2SO_4$ pînă la 90% saturare.
——— determinări spectrofotometrice (280 mμ);
— — — gradientul de concentrație.

Diagrama de separare obținută demonstrează încă o dată marea heterogenitate a soluției proteice, deoarece se obțin circa 12—13 fracțiuni, între care se remarcă prezența a 4 fracțiuni majore. Ca și în cazul proteinelor sarcoplasmatice inițiale (vezi fig. 1), prima fracțiune (I) trece nereținută de suportul DEAE-celulozic. Apar 3 fracțiuni majore (II, IV, V) care se eluează la un gradient continuu de concentrație în NaCl, cuprins între 0 și 0,2 M. Este de subliniat faptul că aceste fracțiuni apar tocmai în intervalul în care apăreau fracțiuni minore (fig. 1 : II—VII), ceea ce arată că salifierea extractului cu $(NH_4)_2SO_4$ a dus la obținerea unui preparat mai concentrat și, ca urmare, procesul de fracționare pe coloană s-a îmbunătățit.

Toate fracțiunile obținute prin separarea pe coloană de DEAE-celuloză au fost analizate determinîndu-se activitatea lor RN-azică, la toate cele 3 valori de pH.

În ceea ce privește activitatea RN-azei cu pH optim 4,0, în figura 3 am redat curba obținută pentru toate fracțiunile proteice analizate. Se poate constata că activitatea RN-azică cea mai intensă o manifestă fracțiunea proteică majoră II; o activitate moderată se găsește la fracțiunile IV, V, și una foarte slabă la fracțiunile VIII și IX. Deci, RN-aza cu pH optim 4,0 este localizată cu precădere pe fracțiunea proteică II.

RN-aza cu pH optim de acțiune 6,0 se localizează, după cum se observă din graficul redat în figura 4, tot pe fracțiunea proteică majoră II,

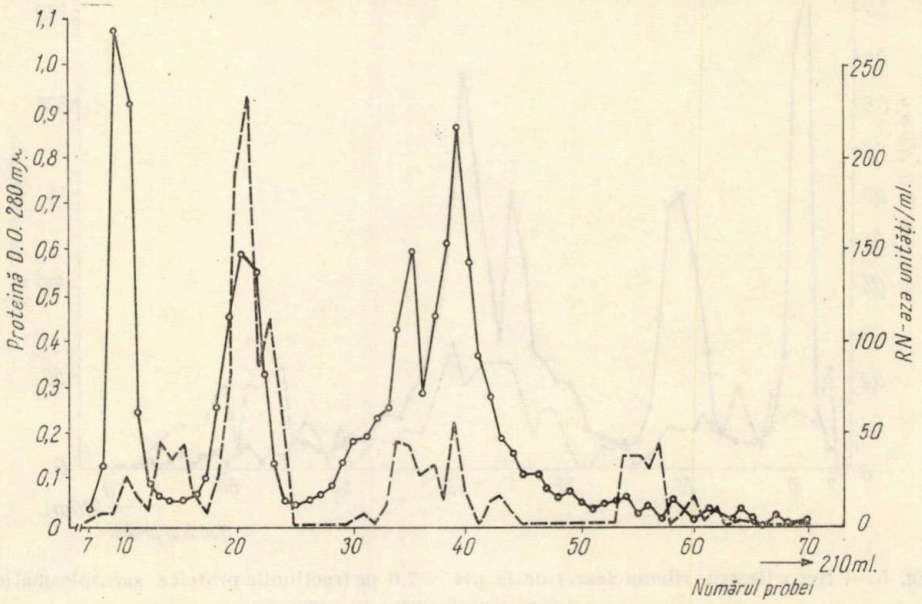


Fig. 3. — Repartizarea ribonucleazei de la pH = 4,0 pe fracțiunile proteice sarcoplasmatice.
——— determinări spetrofotometrice (280 mμ);
– – – activitate RN-azică (unități RN-azice/ml).

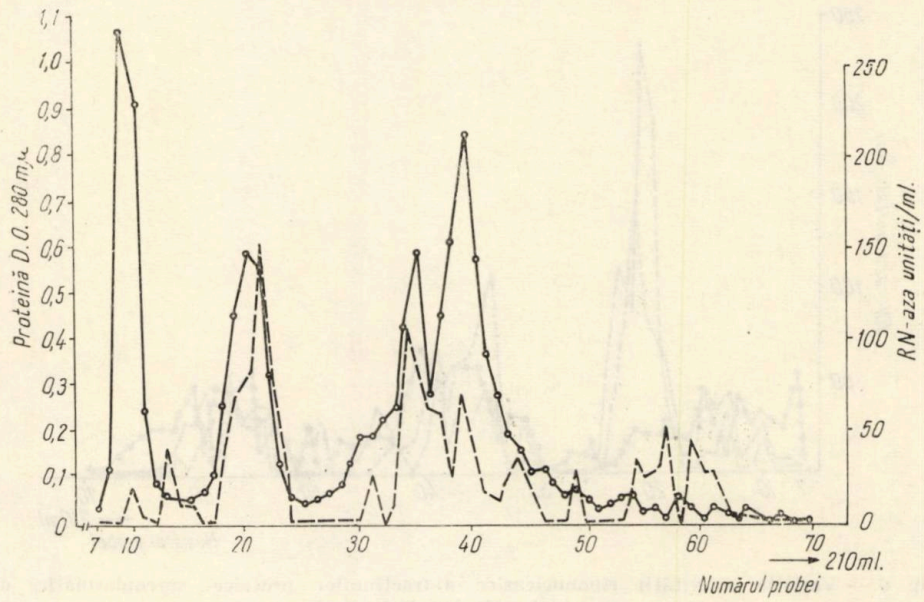


Fig. 4. — Repartizarea ribonucleazei de la pH = 6,0 pe fracțiunile proteice sarcoplasmatice.
——— determinări spectrofotometrice (280 mμ);
– – – activitate RN-azică (unități RN-azice/ml).

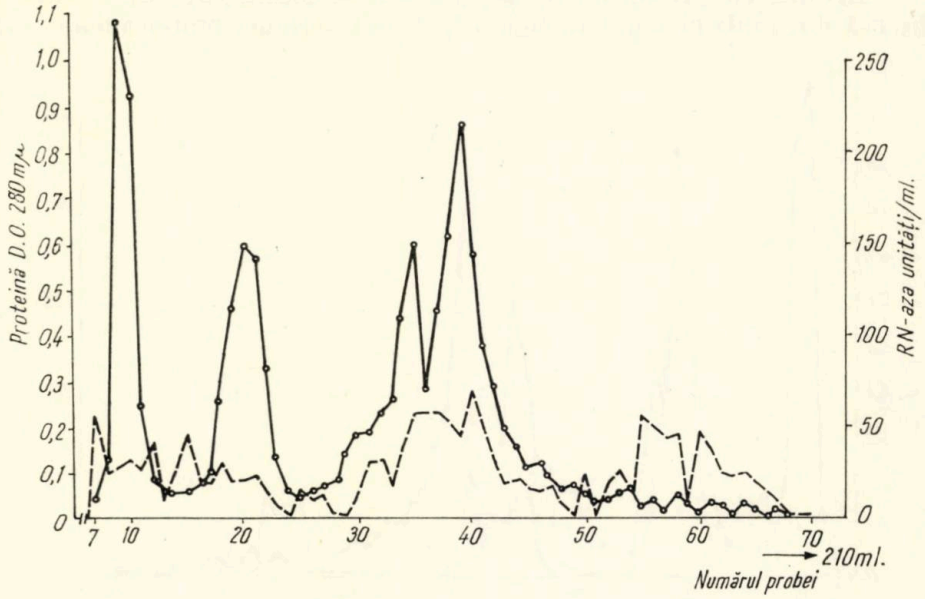


Fig. 5. — Repartizarea ribonucleazei de la pH = 7,0 pe fracțiunile proteice sarcoplasmatice-
——— determinări spectrofotometrice (280 mμ);
– – – activitate RN-azică (unități RN-azice/ml).

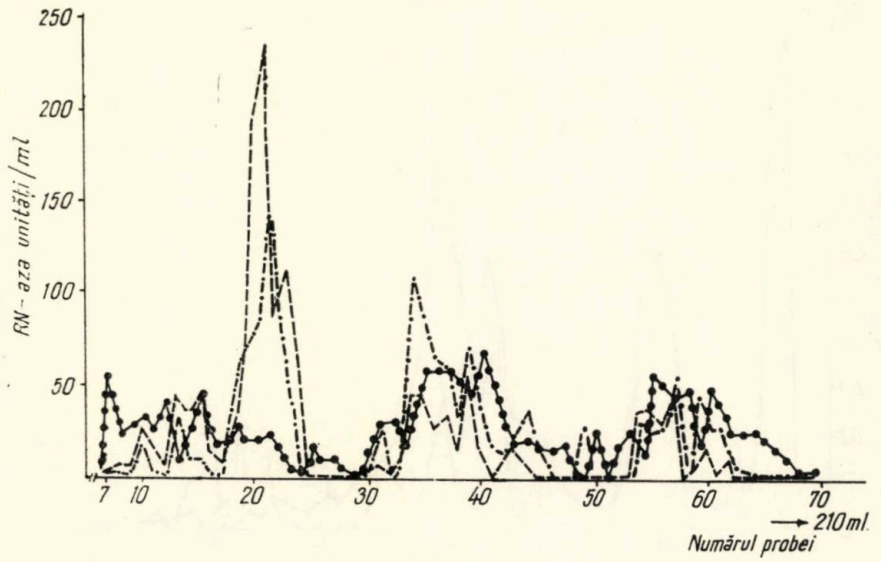


Fig. 6. — Variația activității ribonucleazice a fracțiunilor proteice sarcoplasmatice din mușchiul sartorius de broască.
– – – – RN-aza pH = 4,0;
– • – • – RN-aza pH = 6,0;
•–•–•–• RN-aza pH = 7,0.

dotată cu cea mai intensă activitate enzimatică; această activitate este însă mai redusă decît a RN-azei de la pH 4,0. Fracţiunile IV, V, VIII şi XI posedă o activitate RN-azică şi mai redusă. În concluzie, RN-aza de la pH 6,0 se localizează de preferinţă pe fracţiunile proteice II, IV, VIII şi XI.

În ceea ce priveşte RN-aza cu pH optim 7,0, după cum reiese din figura 5, ea se repartizează practic pe toate fracţiunile proteice eluate şi, din acest motiv, activitatea enzimatică este mai redusă. O activitate RN-azică mai intensă o prezintă fracţiunile eluate înaintea piscurilor I şi II, ca şi fracţiunile III, IV, V, IX, X, XI şi XII. Deci, RN-aza de la pH 7,0 se localizează pe majoritatea fracţiunilor ce se obţin prin separarea cromatografică.

În figura 6 redăm, în ansamblu, curbele de activitate ale celor 3 RN-aze (pH 4,0 ; 6,0 şi 7,0), ceea ce permite compararea localizării lor în funcţie de fracţionarea extractului proteic sarcoplasmatic după prelucrarea lui cu $(NH_4)_2SO_4$.

Tabela 3

Numărul total de unităţi RN-ază/ml pentru fiecare fracţiune separată prin cromatografie pe coloană de DEAE-celuloză

Numărul fracţiunii	pH = 4,0	pH = 6,0	pH = 7,0
0	—	—	119
I	—	23	123
0	42	66	93
II	688	510	129
III	—	33	66
IV	123	341	99
V	129	114	374
VI	—	—	—
VII	—	30	27
VIII	78	108	27
IX	24	51	154
X	—	—	48
XI	12	105	87
XII	—	—	81
XIII	—	—	18

Pentru a scoate şi mai bine în evidenţă distribuţia pe fracţiuni proteice a RN-azelor din muşchiul sartorius de broască, am totalizat numărul de unităţi RN-azice/ml pentru fiecare fracţiune separată (tabela 3).

Valorile înscrise în această tabelă scot şi mai bine în relief faptul că RN-aza de la pH 4,0 se localizează cu precădere pe fracţiunile II, IV şi V; cea de la pH 6,0 apare tot la fracţiunea II, urmată de IV, V, VIII şi XI; RN-aza de la pH 7,0 se localizează în special pe fracţiunea V, apoi pe IX şi pe antefracţiunile I şi II.

Constatările noastre privind faptul că pe proteinele sarcoplasmatice din muşchiul sartorius de broască, separate prin cromatografierea pe DEAE-celuloză, sînt localizate cele trei ribonucleaze, vin în sprijinul presupunerii formulate de Şerban şi Tănăsescu [13]. Aceşti autori au stabilit că fracţiunile proteice sarcoplasmatice I, IV, V, VII şi VIII sînt dotate cu o activitate polarografică, care pune în evidenţă prezenţa şi proporţia grupărilor sulfhidrilice şi disulfidice, existente în unele enzime. Rezultatele noastre privind localizarea RN-azelor din muşchiul sartorius de broască, ca şi cele obţinute de Şerban [18] privind localizarea lacticodehidrogenazei şi a aldolazei din muşchiul gastrocnemian de broască, contribuie la evidenţierea proprietăţilor catalitice ale proteinelor sarcoplasmatice.

CONCLUZII

1. Proteinele sarcoplasmatice din muşchiul sartorius de broască prezintă o heterogenitate avansată, deoarece prin cromatografierea lor pe DEAE-celuloză, se separă în 10—12 fracţiuni proteice.

2. Există o anumită corespondenţă biochimică între gradul de heterogenitate a proteinelor sarcoplasmatice musculare şi tipul histofiziologic al muşchiului.

3. Ribonucleazele „acide" (pH 4,0 şi 6,0) se distribuie de preferinţă pe primele fracţiuni proteice eluate (II, IV şi V), într-un gradient de concentraţie de NaCl cuprins între 0 şi 0,3 M.

4. Ribonucleaza „neutră" (pH 7,0) se găseşte localizată pe fracţiunile proteice V şi IX, care se eluează la un gradient de concentraţie de NaCl mai mare (0,3—0,4 M).

Prezentat la redacţie
la 1 iulie 1969

Institutul de biochimie al Academiei Republicii Socialiste România

BIBLIOGRAFIE

1. T. Iu. Scesno, J. evol. bioh. fiziol., **I**, 2, 145 (1965).
2. K. A. O. Ellem, J. S. Colter, J. Kuhn, Nature, **184**, 984 (1959).
3. J. S. Roth, S. W. Milstein, J. biol. Chem., **196**, 489 (1952).
4. S. F. Epstein, Ucr. biol. j., **36**, 855 (1964).
5. W. L. Meyer, L. Miller, VII Intern. Congress Biochem., Tokyo, 19, 1967, Abstracts V, p. 928.
6. C. Iordache, St. cerc. biochim., **11**, 399 (1968).
7. R. K. Scopes, Nature, **201**, 924 (1964).
8. R. K. Scopes, Biochem. J., **96**, 193 (1966).
9. R. K. Scopes, Biochem. J., **107**, 139 (1968).
10. N. Spencer, Nature, **204**, 742 (1964).
11. K. I. Pravdina, Ţitologhiia, **IX**, 61 (1967).

12. M. KUNITZ, J. Gen. Physiol., **24**, 15 (1940).
13. M. ŞERBAN, D. TĂNĂSESCU, St. cerc. biochim., **4**, 559 (1963).
14. N. A. IUDAEV, Biohimiia, **14**, 51 (1949).
15. V. V. KADÎKOV, V. A. IURIEV, M. D. PRINŢEV, A. V. MATROSOVA, J. evol. bioh. fiziol., **I**, 205 (1965).
16. D. J. HARTSHORNE, S. V. PERRY, Biochem. J., **80**, 9P (1961).
17. C. IORDACHE, S. VASU, Rev. roum. biochim., **6** (1969).
18. M. ŞERBAN, Rev. roum. biochim., **2**, 367 (1965).
19. Y. NAKAO, S. Y. LEE, H. O. HALVORSON, R. M. BOCK, Biochim. Biophys. Acta, **151**, 114 (1968).
20. T. ISHIHARA, M. IRIE, T. UKITA, J. Biochem., Tokyo, **62**, 431 (1967).

CHROMATOGRAPHY OF SARCOPLASMATIC PROTEINS AND LOCALIZATION OF RIBONUCLEASES FROM SARTORIUS MUSCLE OF FROG

SUMMARY

By means of DEAE-cellulose chromatography, the separation of sarcoplasmatic proteins in frog sartorius muscle was studied and RN-ase localization was determined.

These proteins display a marked heterogeneity and can be separated by chromatography into 10—12 fractions. Results suggest a certain biochemical correspondence between their heterogeneity degree and the histophysiological type of the muscle.

Ribonucleases with optimum pH in the „acid" range (4.0 and 6.0) are prevailingly localized on the first protein fractions (II, IV), while those with „neutral" optimum pH (7.0) are especially localized on protein fractions with slow elution (V, IX).

ST. CERC. BIOCHIM., 12, 4, 367–372 (1969)

ASPECTE ALE METABOLISMULUI METIONINEI ^{35}S ŞI SELENOMETIONINEI ^{75}SE LA ŞOBOLANI

VALERIA KOVÁCS

Rezumat. — În lucrarea de faţă s-au studiat comparativ unele aspecte ale metabolismului metioninei ^{35}S şi selenometioninei ^{75}Se la şobolani albi. S-a constatat că în primele 24 ore de la administrarea concomitentă a acestor aminoacizi, o cotă apreciabilă din metionina ^{75}S administrată este degradată cu formarea de diverşi metaboliţi, iar selenometionina ^{75}Se rămîne practic necatabolizată. Acest fapt explică reutilizarea secundară a selenometioninei ^{75}Se în sinteza proteinelor tisulare.

În materialele biologice sînt prezente aproape toate tipurile principale de compuşi anorganici şi organici cu sulf. Funcţiile multora dintre aceştia încă nu sînt clarificate, dar este bine stabilită importanţa aminoacizilor sulfuraţi pentru multe procese biochimice. Pe de altă parte, în cercetări recente s-a arătat că selenometionina poate substitui complet metionina necesară pentru creşterea normală a mutanţilor metionin-dependenţi de *E. coli* [1] şi s-a pus în evidenţă posibilitatea de sinteză a selenometioninei, din radioselenit, în celulele de drojdie [2], [3], în *E. coli* [4] crescute într-un mediu sărac în sulf. Microorganismele crescute în aceste condiţii sînt capabile să formeze enzima adaptivă corespunzătoare, fapt ce demonstrează că proteinele în care metionina este înlocuită prin analogul său cu seleniu şi-au păstrat integritatea lor funcţională. S. M. Harvey şi G. L. Cantoni [5] au pus în evidenţă capacitatea selenometioninei de a înlocui metionina în reacţiile de transmetilare. H. K. Awwad şi colab. [6], [7], studiind încorporarea selenometioninei ^{75}Se în proteinele tisulare şi sanguine la om şi şobolani, au arătat că deşi acest aminoacid se încorporează în proteine, avînd „rate de încorporare" asemănătoare activităţilor anabolice cunoscute la diferite ţesuturi, totuşi transformarea selenometioninei în selenocisteină şi selenocistină este mai scăzută decît în cazul metioninei.

Ţinînd cont de importanţa metabolică a aminoacizilor sulfuraţi şi de interesul pe care-l prezintă studiul metabolismului selenoanalogilor acestor aminoacizi, ne-am propus extinderea studiului comparativ privind unele aspecte ale metabolismului metioninei şi selenometioninei şi asupra cataboliţilor acestor aminoacizi.

MATERIAL ŞI METODĂ

Pentru studiul metabolismului metioninei ^{35}S şi selenometioninei ^{75}Se, aceşti izotopi au fost administraţi intraperitoneal unui lot de 50 şobolani albi, masculi, cu greutatea de 130 g, ţinuţi la o dietă standard, în doze de 0,5 microcurie/g corp pentru metionina ^{35}S şi 1 microcurie pe animal pentru selenometionina ^{75}Se. După 24 ore de la administrarea metioninei, animalele au fost sacrificate prin decapitare, prelevîndu-se organele parenchimatoase (ficat, splină şi rinichi) pentru studiul radiometric [8].

Urina animalelor iradiate a fost colectată timp de 24 ore după administrarea izotopilor de ^{35}S şi ^{75}Se şi de asemenea studiată radiometric [8].

Pentru determinarea captării ^{35}S în aceste organe, probele au fost omogenizate în NaOH N în tub închis, la 70 °C, timp de 24 ore. Din acest omogenat s-a aplicat pe ţintă o cantitate de 0,1 ml. Determinarea încorporării ^{35}S în proteinele hepatice, splenice şi renale a avut loc după precipitarea proteinelor cu acetonă clorhidrică (HCl 1%), după care s-a folosit acelaşi procedeu ca la determinarea captării acestui izotop.

Pentru determinarea captării ^{75}Se în organele studiate, radioactivitatea probelor de ţesut a fost dozată fără nici o prelucrare prealabilă. Studiul încorporării ^{75}Se în proteinele acestor organe s-a efectuat tot după precipitarea proteinelor cu acetonă clorhidrică, după care radioactivitatea probelor a fost determinată direct.

Din urina animalelor studiate s-au determinat radiometric metaboliţii metioninei ^{35}S şi selenometioninei ^{75}Se, şi anume :

1. Aminoacizii şi aminele marcate cu ^{35}S şi ^{75}Se.
2. Cetoaminoacizii marcaţi cu ^{35}S şi ^{75}Se.
3. Sulful anorganic ^{35}S şi sulful esterificat ^{35}S şi compuşii de ^{75}Se cu sarcină negativă, extraşi din urină în mediu acid.

Separarea diferitelor fracţiuni de metaboliţi ai metioninei ^{35}S şi selenometioninei ^{75}Se a avut loc pe răşini schimbătoare de ioni [9], [10].

Extragerea aminoacizilor şi aminelor ^{35}S şi ^{75}Se s-a efectuat cu AMBERLIT IR—120 (în ciclul H^+).

Determinarea radiometrică a fracţiunii tioaminoacidice ^{35}S şi tioaminice ^{35}S s-a efectuat după eluarea acesteia de pe AMBERLIT IR—120 cu o soluţie de NH_4OH 1,5 N, evaporare la sec şi dizolvarea reziduului uscat în 0,5 ml apă distilată, din care pe ţintă s-a aplicat 0,1 ml. În acelaşi eluat, radioactivitatea fracţiunii selenoaminoacidice ^{75}Se şi selenoaminice ^{75}Se ($AA^{75}Se + AM^{75}Se$) s-a determinat prin diferenţa dintre radioactivitatea globală a ^{75}Se ($G^{75}Se$) şi suma radioactivităţilor fracţiunilor cetoselenoaminoacizilor ^{75}Se ($CetoA^{75}Se$) şi a diferiţilor compuşi de ^{75}Se cu sarcină negativă, extraşi în mediu acid ($A^{75}Se$).

$$(AA^{75}Se + AM^{75}Se) = G^{75}Se - (CetoA^{75}Se + A^{75}Se)$$

Extragerea sulfului anorganic ^{35}S, a sulfului esterificat ^{35}S şi a unor compuşi de ^{75}Se cu sarcina negativă în mediu acid s-a efectuat cu AMBERLIT IR—410 în ciclul Cl^-. După eluarea acestor fracţiuni cu HCl 4%, radioactivitatea fracţiunii de sulf anorganic ^{35}S şi de sulf esterificat ^{35}S

a fost determinată în aceleaşi condiţii ca şi în cazul fracţiunii tioaminoacidice ^{35}S şi tioaminice ^{35}S. În acelaşi eluat a fost evaluată radioactivitatea compuşilor de ^{75}Se cu sarcină negativă în mediu acid, după cum urmează:

$$(A^{75}Se) = (CetoA^{75}Se + A^{75}Se) - (CetoA^{75}Se + R^{75}Se),$$

unde $(R^{75}Se)$ = radioactivitatea reziduală de ^{75}Se.

Extragerea fracţiunii cetoaminoacizilor ^{35}S şi cetoselenoaminoacizilor ^{75}Se s-a făcut pe răşină AMBERLIT IR—410 în ciclul OH^-. După eluarea fracţiunii cetoaminoacizilor de pe răşină cu HCl 4%, determinarea radioactivităţii fracţiunii cetoaminoacizilor ^{35}S s-a efectuat în aceleaşi condiţii ca şi în cazul fracţiunilor tioaminoacidice ^{35}S şi tioaminice ^{35}S. În acelaşi eluat s-a evaluat radioactivitatea fracţiunii cetoselenoaminoacizilor ^{75}S, după formula următoare:

$$(CetoA^{75}Se + R^{75}Se) - R^{75}Se = CetoA^{75}Se.$$

Determinarea radiometrică a sulfului ^{35}S a fost efectuată cu numărătorul electric IIC 10 000 FLOX, cu contor Geiger-Müller VEB VAKUTRONIK VA—Z 310, cu fereastră terminală 2 mg/cm^2. Măsurătorile radiometrice ale ^{75}Se au fost efectuate cu numărătorul de particule NUMEDIT 744, adaptat cu o sondă de scintilaţie cristal cu turn NaS (Fe).

Pentru a compara datele obţinute în diferitele experienţe efectuate pe compuşi radioactivi care posedau o activitate iniţială diferită, activitatea determinată în probele de ţesut şi urină a fost exprimată în procente faţă de cantitatea totală de activitate introdusă în organism şi raportată la organul întreg uscat sau la capacitatea întreagă de urină eliminată în timp de 24 ore de animalele studiate.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Pe baza rezultatelor obţinute (tabela 1) semnalăm după 24 ore de la administrarea metioninei ^{35}S şi selenometioninei ^{75}Se o captare mai ridicată de ^{75}Se decît de ^{35}S în ficat, splină, rinichi şi în proteinele acestor

Tabela 1

Mediile distribuţiilor radioactivităţii în ficatul, splina şi rinichii şobolanilor albi după 24 ore de la administrarea concomitentă a metioninei ^{35}S şi selenometioninei ^{75}Se

	Ficat		Rinichi		Splină	
	Total %	În proteine %	Total %	În proteine %	Total %	În proteine %
^{35}S	9,69±0,63	7,02±0,70	1,44±0,08	1,17±0,08	0,61±0,10	0,41±0,08
^{75}Se	13,59±0,8	11,83±1,1	2,51±0,27	1,99±0,23	0,99±0,15	0,55±0,08

Total % — radioactivitatea globală din probele de ţesut, exprimată în % faţă de doza administrată
Proteine% — radioactivitatea din proteine, exprimată în % faţă de doza administrată

Tabela 2

Mediile radioactivităţilor urinare ale diferitelor fracţiuni examinate după 24 ore de la administrarea concomitentă a metioninei ^{35}Se şi selenometioninei ^{75}Se la şobolani albi

	Urine				
^{35}S	GA ^{35}S %	AA ^{75}S + AM ^{35}S %	^{35}S Anorg. + % ^{35}S Ester.	CeA — ^{35}S %	Rx — ^{35}S %
	10,1 ± 0,43	2,49 ± 0,17	0,39 ± 0,03	0,32 ± 0,01	6,90
^{75}Se	GA ^{75}Se %	AA ^{75}Se + AM ^{75}Se %	Compuşi ai ^{75}Se cu sarcină negativă %	CeA-^{75}Se %	Rx-^{75}Se %
	2,57 ± 0,22	1,78 ± 0,16	0,38 ± 0,01	0,15 ± 0,03	0,26

GA-fracţiune urinară globală
AA + AM — fracţiunea aminoacidică şi aminică urinară
SAnoerg. + SEster, — fracţiunea urinară de sulf anorganic şi sulf esterificat
CeA — fracţiunea cetoaminoacidică urinară

organe. Totodată, după cum rezultă din tabela 2, radioactivitatea urinară globală a metaboliţilor cu ^{35}S este de 10,1%, în timp ce radioactivitatea metaboliţilor cu ^{75}Se reprezintă numai 2,57% din doza administrată. Din această radioactivitate urinară globală a ^{35}S, 24,6% (corespunzînd la 2,49% din doza administrată) reprezintă radioactivitatea fracţiunii AA + + AM ^{35}S; 3,8% (corespunzînd la 0,39% din doza administrată) reprezintă radioactivitatea fracţiunii sulfului anorganic ^{35}S şi a sulfului esterificat ^{35}S, iar 3,3% (corespunzînd la 0,32% din doza administrată) reprezintă radioactivitatea fracţiunii de cetoacizi ^{35}S. Restul de 68,3% (corespunzînd la 6,9% din radioactivitatea administrată) poate fi pus pe seama altor metaboliţi intermediari ai metioninei ^{35}S, eliminaţi prin urină.

În ceea ce priveşte radioactivitatea fracţiunii cu ^{75}Se, corespunzătoare fracţiunilor de metaboliţi ^{35}S studiaţi, ea reprezintă 2,31% din doza administrată (ceea ce corespunde la 89,9% din radioactivitatea urinară globală de ^{75}Se), din care 69,3% reprezintă radioactivitatea fracţiunii AA + AM ^{75}Se şi numai 0,26% din radioactivitatea de ^{75}Se administrată (reprezentînd 10,1% din radioactivitatea urinară totală) poate fi pusă pe seama ^{75}Se care a apărut în urma metabolizării selenometioninei ^{75}Se (fig. 1). Ţinînd cont de faptul că s-a determinat numai radioactivitatea globală a fracţiunii aminoacidice şi aminice cu ^{75}Se şi a fracţiunii compuşilor de ^{75}Se, extraşi din urină în mediu acid, fără un studiu mai detaliat în ceea ce priveşte identificarea compuşilor care fac parte din aceste fracţiuni, în lucrarea de faţă nu se insistă asupra interpretării amănunţite a acestor rezultate.

Totuşi, e necesar de a menţiona că dacă în cazul metioninei ^{35}S cantitatea urinară a metaboliţilor neidentificaţi reprezintă 68,3% din radioactivitatea urinară globală, în cazul selenometioninei ^{75}Se valoarea radioactivităţii acestor metaboliţi este aproximativ de 6 ori mai mică. Această diferenţă mare între eliminarea urinară a metaboliţilor metioninei ^{35}S şi selenometioninei ^{75}Se după 24 ore este, foarte probabil, consecinţa cata-

bolizării mult mai scăzute şi diferite a selenometioninei ^{75}Se decît a analogului ei cu ^{35}S. Deci, conform rezultatelor obţinute, în primele 24 ore de la administrare o cotă apreciabilă din metionina ^{35}S este degradată, cu formarea de diverşi metaboliţi. În acest interval de timp, selenometionina ^{75}Se rămîne practic necatabolizată. Datorită acestui fapt, radioacti-

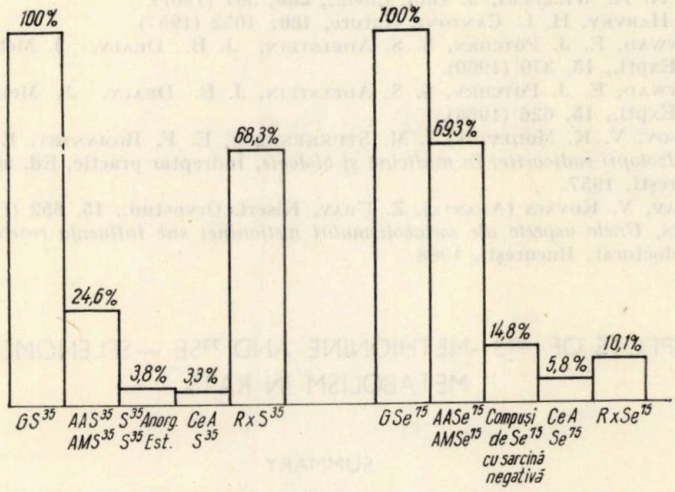


Fig. 1. — Distribuirea radioactivităţii pe fracţiuni din radioactivitatea urinară totală. GS—fracţiunea urinară globală ;AA+AM-fracţiunea aminoacidică şi aminică urinară ; SAnorg.+SEst·—fracţiunea urinară de sulf anorganic şi sulf esterificat ; GeA-funcţiunea cetoaminoacidică urinară ; Rx-radioactivitatea urinară restantă. Valorile sînt exprimate în % faţă de valoarea radioactivităţii urinare globale.

vitatea de ^{75}Se din fracţiunea AA + AM ^{75} Se reprezintă 69,3 % din totalul radioactivităţii eliminate, dar ea este mai scăzută decît radioactivitatea corespunzătoare cu ^{35}S. Acest fapt explică nivelul mai ridicat de încorporare al selenoaminoacizilor ^{75}Se în proteinele hepatice, splenice şi renale, în comparaţie cu încorporarea aminoacizilor cu ^{35}S după 24 ore de la administrarea concomitentă a celor două metionine radioactive. Selenometionina ^{75}Se, practic necatabolizată în acest interval de timp, este reutilizată în sinteza proteinelor tisulare, ocupînd locul metioninei ^{35}S degradate.

CONCLUZII

1. Administrînd concomitent metionină ^{35}S şi selenometionină ^{75}Se, în primele 24 ore are loc o încoporare mai ridicată a ^{75}Se decît a ^{35}S atît în ficat, splină şi rinichi, cît şi în proteinele hepatice, splenice şi renale ale animalelor studiate.

2. Eliminarea urinară a radioactivităţii globale ^{35}S şi a fracţiunilor de $AA^{35}S + AM^{35}S$, ^{35}S—Anorg. + ^{35}S—Ester. şi a $CeA^{35}S$ este mai crescută faţă de radioactivitatea acestor fracţiuni cu ^{75}Se.

Prezentat la redacţie la 26 decembrie 1968

Facultatea de biologie Catedra de biochimie I. M. F. Cluj

BIBLIOGRAFIE

1. D. B. Cowie, G. N. Cohen, Biochim. Biophys. Acta, **26**, 252 (1957).
2. M. Blau, J. F. Holland, At. Energy Comm. Symp., **6**, 409 (1966).
3. L. J. Anghileri, R. O. Marques, Arh. Rep. Com. Nucl. Energia At. Inform, **154**, 12, (1965).
4. T. Tuve, H. H. Williams, J. Biol. Chem., **236**, 597 (1961).
5. S. Mudd Harvey, H. L. Cantoni, Nature, **180**, 1052 (1957).
6. H. K. Awwad, E. J. Potchen, S. S. Adelstein, J. B. Dealy, J. Metabolism. Clin. Exptl., **15**, 370 (1960).
7. H. K. Awwad, E. J. Potchen, S. S. Adelstein, J. B. Dealy, J. Metabolism. Clin. Exptl., **15**, 626 (1966).
8. I. I. Ivanov, V. K. Modestov, I. M. Stukkenberg, E. F. Romantev, E. T. Vorobiev, *Izotopii radioactivi în medicină şi biologie*, Îndreptar practic, Ed. medicală, Bucureşti, 1957.
9. J. Szántay, V. Kovács (Alania), Z. Uray, Kiserl. Orvostud., **15**, 652 (1963).
10. V. Kovács, *Unele aspecte ale metabolismului metioninei sub influenţa razelor X*, Teză de doctorat, Bucureşti, 1968.

SOME ASPECTS OF ^{35}S -METHIONINE AND ^{75}SE —SELENOMETHIONINE METABOLISM IN RATS

SUMMARY

In the present investigation comparative experiments have been carried out to study the metabolism of ^{35}S— methionine and ^{75}Se — selenomethionine in albino rats. It was found that 24 hours after the simultaneous administration of the amino acids an appreciable amount of ^{35}S — methionine was broken down with concomitant formation of various metabolites, whereas ^{75}Se — selenomethionine remained virtually noncatabolised. This fact explains the secondary re-utilization of ^{75}Se — selenomethionine in tissular protein synthesis.

ST. CERC. BIOCHIM., 12, 4, 373–375, (1969)

ELEMENTE DISTINCTIVE ALE ELECTROFOREGRAMEI PROTEINELOR SERICE ÎN ERIZIPEL.

I. I. NIȚESCU, A. CONSTANTINESCU, M. MIHĂIȚĂ

Rezumat. — În erizipel, spre deosebire de majoritatea bolilor infecțioase, se constată o scădere sau cel mult o menținere în limite normale a fracțiunii γ-globulinice.

α_2-Globulinele cresc masiv.

Fracțiunea β-globulinică apare ușor crescută, spre deosebire de creșterea pronunțată a acestei fracțiuni în alte boli infecțioase.

Aceste constatări pot constitui elemente distinctive ale proteinogramei în erizipel.

Aplicarea electroforezei pe hîrtie în diferite maladii a constituit un remarcabil succes, permițînd chiar introducerea în practica medicală a noțiunii de semiologie electroforetică [1].

Mai puțin cercetată este însă valoarea și utilitatea practică a acestei metode în domeniul bolilor infecțioase. De aceea ne-am propus în prezenta lucrare studiul modificărilor tabloului electroforetic al proteinogramei, lipidogramei și glucidogramei în erizipel, maladie infecțioasă.

Proteinograma electroforetică în erizipel ne-a arătat, la un număr de 34 cazuri, unele modificări demne de semnalat.

Astfel, am constatat creșterea masivă a subfracțiunii α_2 — globulinice, alături de scăderea albuminelor, sau menținerea acestora în limite normale, modificări de altfel frecvente în majoritatea stărilor inflamatoare și exudative, menționate și de alți autori [2].

Sub influența tratamentului cu antibiotice, majoritatea cazurilor studiate de noi au arătat scăderea rapidă a subfracțiunii α_2— globulinice chiar de la începutul tratamentului, restabilirea completă a tabloului electroforetic avînd loc în timp de cîteva săptămîni.

Mai interesantă este modificarea proteinogramei datorită fracțiunii γ— globulinice, constînd în scăderea sau menținerea sa în limite normale.

Acest fapt prezintă interes, avînd în vedere că în majoritatea bolilor infecțioase cronice sau parazitare (limfogranulomatoza veneriană, sifilis terțiar, tuberculoză pulmonară și cutanată, colibaciloză, infecții stafilococice și streptococice, variolă, pemfigus etc.) γ — globulinele cresc foarte mult [3].

Am observat, de asemenea, că fracțiunea β — globulinică apare ușor crescută, comparativ cu creșterea masivă a — globulinelor constatată

în cazul altor maladii infecțioase, ceea ce poate constitui un alt element electroforetic distinctiv al erizipelului, menționat de noi.

În sfîrșit, se poate face și o altă observație. Bolile streptococice și stafilococice prezintă un paralelism între creșterea globulinelor α_2 și γ, ceea ce noi nu am constatat în erizipel.

Menționăm că modificările tabloului electroforetic al proteinelor serice în erizipel le-am întîlnit în mod constant la cazurile studiate.

Tabela 1

Rezultatele cercetărilor electroforetice ale serului sanguin în 34 cazuri de erizipel

Componente proteice ale serului sanguin %	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$
Albumine	41,0	2
α_1-globuline	8,7	0,8
α_2-globuline	22,7	1,3
β-globuline	13,1	1,6
γ-globuline	14,5	1,1

În tabela 1 sînt prelucrate, prin calcul statistic, valorile procentuale ale fracțiunilor de proteine serice în cele 34 cazuri de erizipel studiate.

Eventual, este de așteptat ca diferența dintre valorile limită să crească întrucîtva, dacă cercetările s-ar extinde asupra unui număr mai mare de cazuri.

În figura 1 prezentăm aspectul proteinogramelor obținute cu un aparat de electroforeză pe hîrtie, adaptat pentru tehnica verticală, la două din cazurile studiate, și valorile relative ale fracțiunilor proteice obținute după colorare cu albastru de bromfenol și fotometrare.

Lipidograma nu a prezentat elemente caracteristice.

Glucidograma a fost modificată, subfracțiunea corespunzătoare α_2 — globulinelor fiind crescută, fără ca această modificare să constituie un element caracteristic, deoarece ea se regăsește și pe glucidograma altor maladii.

Prezentat la redacție
la 26 decembrie 1968

Institutul de fiziologie normală și patologică
București

BIBLIOGRAFIE

1. J. Enselme, I. Dreyfus, *Séméiologie éléctrophoretique*, Edit. Camugli, Lyon, 1955, p. 89.
2. M. Girard, I. Dechosal, F. Rousselet, *Pratique d'éléctrophorèse sur papier en biologie clinique*, Edit. Doin, Paris, 1958, p. 127.
3. H. J. Antweiler, *Die Quantitative Elektrophorese in der Medizin*, Springer Verlag, Berlin, 1952, p. 53—103.

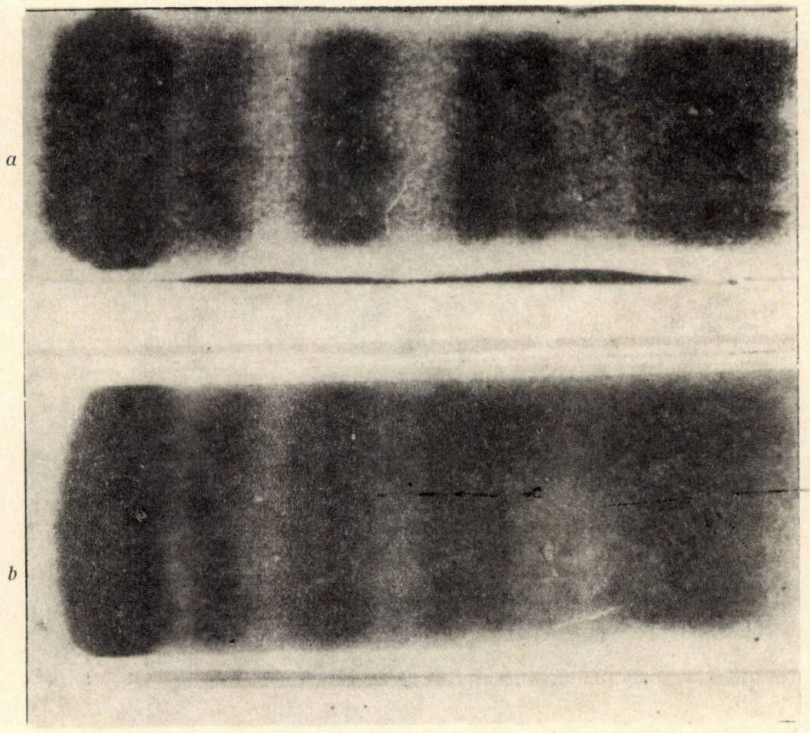


Fig. 1. — Electroforeza proteinelor serice în două cazuri de erizipel:
a — Albumine 40%; α_1 — globuline 9%; α_2 — globuline 22,5%; β — globuline 15%; γ — globuline 13,5%.
b — Albumine 39%; α_1 — globuline 9%; α_2 — globuline 23%; β — globuline 13,5%; γ — globuline 15,5%.

CHARACTERISTICS OF SERUM PROTEIN ELECTROPHEROGRAMS IN ERYSIPELAS

SUMMARY

In erysipelas, contrary to most of the infectious diseases, a decrease or, at least, a maintenance in the normal range of the gamma-globulin fraction was noticed.

The alpha 2—globulins appreciably increase.

The beta-globulins slightly increase as compared to the marked increase of this fraction found in other infectious diseases.

These findings can be considered as characteristic elements of proteinograms in erysipelas.

ST. CERC. BIOCHIM., 12, 4, 377–385 (1969)

FOSFATAZA ACIDĂ ȘI FOSFORUL ANORGANIC DIN PORUMB ÎN PRIMELE ETAPE DE CREȘTERE

DOINA POPOV

Rezumat. — Electroforeza în sistem vertical în gel de poliacrilamidă a preparatelor proteice brute ale formațiunilor semințelor în repaus evidențiază 2—3 fracțiuni electronegative și 2—5 electropozitive. Modificarea spectrului enzimogramei o dată cu germinarea are loc în primele două zile. Frunzele, la 8—15 zile de la răsărire, conțin patru forme moleculare electronegative, indiferent de prezența sau absența procesului fotosintetic. Activitatea fosfatazei acide și fosforul anorganic ating maximul activității fosfatazice la plantule după 4 zile, iar la scutel și endosperm după 6 zile de germinare. În frunză, în perioada cercetată, activitatea fosfatazei acide se mărește în citoplasmă, pe cînd în sucul vacuolar scade.

Într-o lucrare anterioară [1] s-a analizat separarea electroforetică în gel de amidon și poliacrilamidă a fosfatazei acide nespecifice din diferite formațiuni și organe ale porumbului. În continuare, ne-am propus urmărirea dinamicii de apariție — în procesul germinării seminței și în primele frunze — a izofosfatazelor acide, electroforetic distincte în gel de poliacrilamidă. Paralel cu aceasta, am determinat activitatea fosfatazică și fosforul anorganic din formațiunile seminței în procesul de germinare, ca și din primele frunze. Scopul acestei lucrări este acela de a avea un tablou al activității fosfatazei acide din porumb în primele 18 zile de la începerea germinării, sub raportul formelor moleculare separabile pe cale electroforetică, al intensității activității față de β-glicerofosfat ca substrat și al conținutului de fosfor anorganic din formațiunile și organele cercetate.

V. Jaaska și colab. [2] au separat, la pH 5,2, o singură zonă cu activitate fosfatazică față de β-glicerofosfat, prin electroforeza în disc, pe gel de poliacrilamidă, a extractelor obținute din plantule etiolate de porumb. A. Nemec [3] a arătat că în primele cinci zile de germinare, activitatea fosfatazei acide din semințele de porumb, luate împreună cu plantula, prezintă un minim la două zile, pentru ca apoi să crească continuu. F. A. Haskins [4] a analizat activitatea fosfatazei acide din embrioni, tulpini etiolate și plantule verzi de porumb, stabilind o creștere a activității în sensul embrion < tulpină < plantulă. Recent, Ph. Matile și colab. [5] au stabilit două valori optime de pH : 5,0 și 6,5 pentru activitatea fosfatazei acide din sferozomii plantulelor de porumb, la două zile de germinare.

În literatură există date referitoare la cantitatea de fosfor din sămînța de porumb, tulpină, ştiulete şi rădăcină [6, a], [7]. Nu am găsit însă determinări ale cantităţii de fosfor din formaţiunile seminţei în perioada germinării.

MATERIAL ŞI METODĂ

S-a lucrat pe seminţe de porumb HD—336 (puse la dispoziţie de I.C.C.P.T. — Fundulea).

Axul embrionar, scutelul şi endospermul seminţelor în stare de repaus s-au separat manual şi s-au mojarat cu o soluţie neutră de NaCl 9 $^0/_{00}$, în raporturile de extracţie 10 ml/1 g, 5 ml/1 g şi 2 ml/1 g. Germinarea s-a urmărit la întuneric timp de 9 zile, după o prealabilă dezinfectare a seminţelor cu 3% H_2O_2. Plantula şi restul din scutel, respectiv endosperm, s-au izolat la 2, 4, 6 şi 9 zile de germinare şi s-au mojarat cu o soluţie neutră de NaCl 9$^0/_{00}$, în raporturile 1 ml/1 g, 5 ml/1 g şi 1,5 ml/1 g. Pentru frunze, seminţele s-au semănat în cutii cu pămînt şi plantele s-au crescut la lumina artificială. Frunzele recoltate la 11, 13, 15 şi 18 zile de la semănare, adică în intervalul de 8—15 zile de la răsărire, s-au trecut printr-o moară de laborator şi s-au extras cu aceeaşi soluţie de mai sus, în raportul de 0,4 ml/1 g. S-a lucrat şi pe frunze etiolate recoltate la 10 zile de la semănare.

Extracţia s-a făcut 1 oră la temperatura camerei, apoi materialul s-a stors prin două straturi de tifon şi s-a centrifugat 20 min la 4250 g. Supernatantul s-a dializat pînă a doua zi faţă de apă distilată şi s-a folosit pentru determinarea activităţii fosfatazei acide sau s-a liofilizat pentru electroforeză.

Sucul vacuolar din plantulele de porumb, la 4, 6, 9 zile de germinare, ca şi din frunze la 8, 10, 12, 15 zile de la răsărire, s-a obţinut prin presarea materialului la 150 atm, într-o presă Hafico. După dializă, sucul s-a folosit pentru determinarea activităţii fosfatazei acide sau s-a liofilizat pentru electroforeză.

Electroforeza preparatelor proteice brute s-a făcut în gel de poliacrilamidă 5%, în sistem vertical, în tampon TRIS-EDTA. Na_2—H_3BO_3, pH 8,4[8], pe plăci de 13 ×8 cm, timp de 3 ore la 290 V şi 17—25 mA/13cm. Evidenţierea benzilor cu activitate fosfatazică s-a făcut după metoda K. Hruska [9] modificată [1], utilizînd ca substrat β-glicerofosfat de sodiu.

Determinarea activităţii fosfatazei acide din extracte şi sucuri s-a făcut cu β-glicerofosfat de sodiu ca substrat, în soluţie tampon de acid succinic-hidroxid de sodiu 0,2 M, pH 6,2, după modificarea R. Portocală, L. Popa [10] a metodei Fiske-SubbaRow. Activitatea fosfatazică s-a exprimat în γP eliberat de enzimă din 1 ml extract în timp de 30 min la 30° C.

Estimarea fosforului anorganic din formaţiunile şi organele de porumb studiate s-a făcut înainte de dializa preparatelor. Cantitatea de fosfor anorganic s-a exprimat în γP/g material umed.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Separarea electroforetică a izofosfatazelor. La electroforeza în gel de poliacrilamidă, axul embrionar şi scutelul seminţei de porumb în repaus evidenţiază două fracţiuni electronegative cu activitate fosfatazică, iar endospermul trei fracţiuni [1].

Urmărind aspectul electroforetic al formelor moleculare ale fosfatazei acide din aceste formaţiuni ale seminţei de porumb după 2, 4, 6 şi 9 zile de germinare, se regăseşte imaginea descrisă anterior la 4—5 zile : patru fracţiuni electroforetice în cazul axului embrionar, trei în cazul scutelului, şi patru în cel al endospermului (fig. 1). Schimbarea numărului de fracţiuni fosfatazice — şi deci a spectrului formelor moleculare — o dată cu germinarea are deci loc în primele două zile. Acest aspect nu se modifică în cursul primelor 9 zile de germinare pentru nici una din cele trei formaţiuni urmărite. O dată cu germinarea se remarcă însă intensificări ale activităţii unora dintre formele moleculare şi diminuări ale altora. Este cazul formaţiunii celei mai electronegative a axului embrionar şi a scutelului, a cărei activitate se intensifică, fiind maximă la 9 zile de germinare, precum şi al fracţiunii celei mai slab electronegative din endosperm, a cărei activitate fosfatazică se micşorează, apărînd după 9 zile de germinare doar ca urme. Notăm că enzimogramele preparatelor proteice din perioada de repaus şi chiar după 2 zile de germinare, prezintă, pe lîngă fracţiunile albastre ale fosfatazei acide, unele zone albe sau slab gri care influenţează acurateţea fotografiei.

În a 7-a zi de germinare s-au analizat separat tulpiniţa şi rădăcinile. Enzimograma fosfatazei acide din aceste organe este asemănătoare ca aspect cu aceia a plantulei. Deci, tulpiniţa şi rădăcinile nu prezintă spectre diferite ale izofosfatazelor acide.

În literatură se menţionează că în extractele de ficat şi rinichi de iepure s-au decelat fosfataze electropozitive, iar în extractele de muşchi electronegative [11]. De aceea, în lucrarea de faţă am controlat în plus, dacă nu cumva pe lîngă fosfatazele electronegative, extractele brute din formaţiunile şi organele de porumb cercetate conţin şi forme moleculare electropozitive. Rezultatele obţinute au arătat că formaţiunile seminţei de porumb în repaus conţin şi fosfataze electropozitive. Astfel, din axul embrionar se separă trei fracţiuni, din scutel cinci şi din endosperm două (fig. 2).

Activitatea enzimatică a acestor fracţiuni este însă mult mai mică decît aceea a fracţiunilor electronegative. După 2 şi 4 zile de germinare a seminţei, fracţiunile electropozitive se observă numai ca urme la preparatele proteice al endospermului. Aceasta arată că în cursul germinării sămînţa sau le-a catabolizat, sau le-a transformat în forme moleculare electronegative.

S-a urmărit fosfataza acidă din sucul vacuolar al plantulelor seminţelor germinate timp de 4, 6 şi 9 zile, pentru a stabili dacă formele moleculare ale acestei enzime se găsesc în sucul vacuolar sau sînt fixate de formaţiuni şi se eliberează numai sub acţiunea unui extractant. Enzimogramele sucului vacuolar prezintă patru fracţiuni fosfatazice, iar aspectul enzimogramei este asemănător celui al extractelor obţinute din plantulă.

Fracţiunea cea mai electronegativă are o activitate puternică; celelalte fracţiuni sînt slab reprezentate. În plantulele de porumb, formele moleculare ale fosfatazei acide se găsesc libere atît în sucul vacuolar cît şi în citoplasmă.

Fosfataza acidă din extractele frunzelor de porumb recoltate la 11, 13, 15 şi 18 zile de la semănare, ca şi din sucul vacuolar al acestora, prezintă la electroforeza în gel de poliacrilamidă acelaşi aspect. Se separă patru forme moleculare, dintre care două, cele mai electronegative, sînt puternic reprezentate (fig. 3). Extractele şi sucul vacuolar al frunzelor nu conţin fracţiuni fosfatazice electropozitive.

Analizînd enzimograma fosfatazei acide din plantulele de porumb, comparativ cu a celei din frunze, se remarcă prezenţa în plus în extractele de frunze a unei forme moleculare cu activitate enzimatică foarte pronunţată şi care, de altfel, este cea mai electronegativă dintre fracţiuni.

Era interesant de văzut dacă prezenţa în frunze a acestei fracţiuni este sau nu datorată procesului de fotosinteză. De aceea, am urmărit separarea electroforetică a fosfatazei acide dintr-un extract proteic brut de frunze etiolate. Enzimograma obţinută relevă cele patru fracţiuni ale frunzelor normale, cu deosebirea că fracţiunea cea mai electronegativă are în acest caz o activitate întrucîtva mai slabă.

Activitatea fosfatazei acide. Activitatea fosfatazei acide din formaţiunile seminţei de porumb în repaus, faţă de β-glicerofosfat ca substrat, este foarte scăzută (tabela 1). Pentru o comparaţie aproximativă a acti-

Tabela 1

Activitatea fosfatazei acide din formaţiunile seminţei de porumb în repaos *

(ml folosiţi pentru dozarea fosforului eliberat = 7)

Formaţiunea seminţei	Raportul de extracţie g/ml	Cantitatea de extract folosită ml	γp	γP/g material
Ax embrionar	1/10	3	164	1094
Scutel	1/5	3	142	473
Endosperm	1/2	4	132	141

* În toate cazurile (tabelele 1, 2, şi 3) reacţia enzimatică s-a desfăşurat cu 1 ml de substrat (β-glicerofosfat de sodiu 1,5%) şi 5 ml soluţie tampon acid succinic-NaOH pH = 5, 2. timp de 30 min la 30°C. Oprirea reacţiei s-a făcut cu 5 ml acid tricloracetic (20% pentru formaţiunile seminţei negerminate, 10% pentru sămînţa germinată şi 6% pentru frunză) urmată de centrifugare 10 min la 3000 g. Din supernatant s-a luat o parte alicotă (dată în fiecare tabel) şi după adăugarea reactivilor de culoare s-a adus la un volum total de 25 ml.

vităţii, am calculat valorile obţinute pentru 1 g de material. Axul embrionar prezintă activitatea cea mai mare, scutelul una intermediară, iar endospermul cea mai mică.

Urmărind fosfataza axului embrionar în cursul germinării seminţei (tabela 2), se remarcă un maxim al activităţii la 4 zile, pentru ca după 9 zile de germinare activitatea plantulei să fie comparabilă cu cea de la 2 zile. Activitatea fosfatazică a extractelor din tulpiniţă şi rădăcini în a 7-a zi de germinare este similară cu cea a plantulei şi egală pentru aceste două organe. Activitatea fosfatazică a scutelului şi endospermului atinge

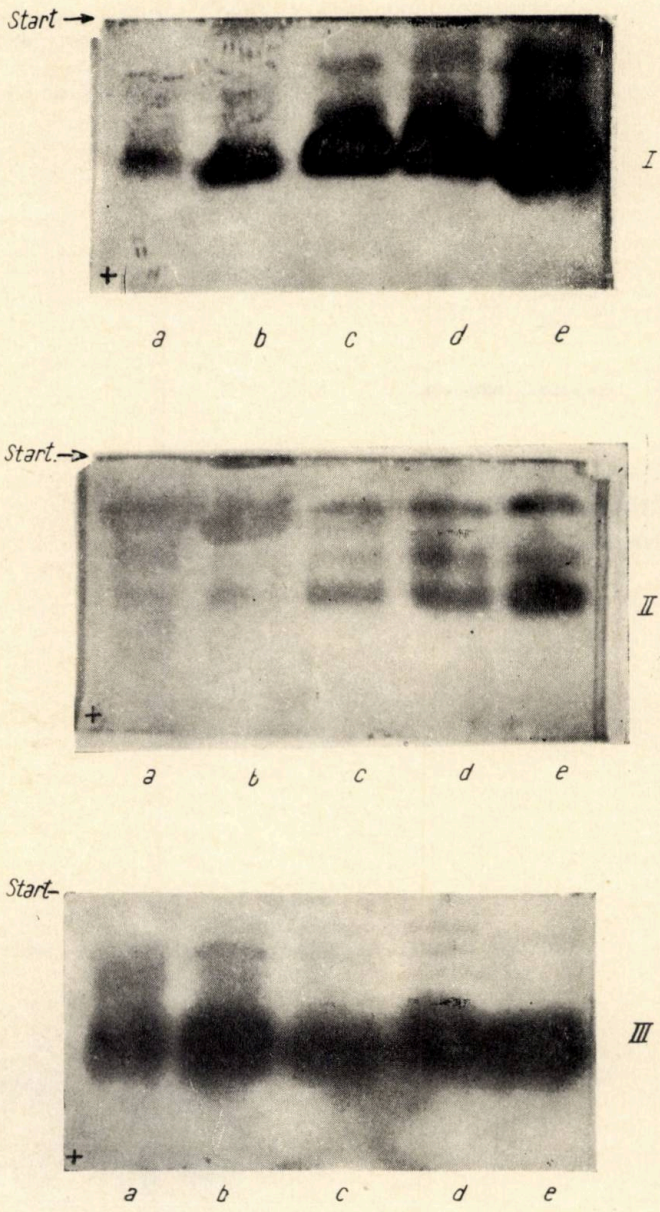


Fig. 1. — Izofosfatazele electronegative din axul embrionar (I), scutelul (II) și endospermul (III) seminței de porumb:
a — din formațiunea semințel în repaus; *b* — după 2 zile; *c* — 4 zile; *d* — 6 zile și *e* — 9 zile de germinare.

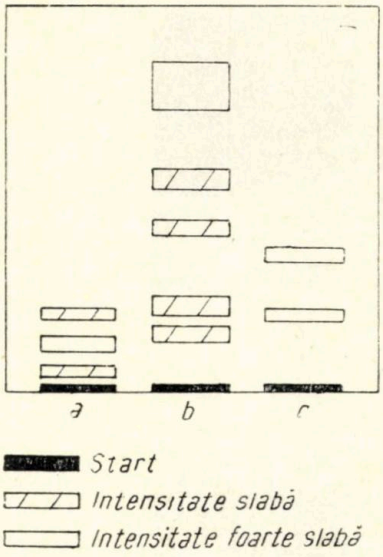


Fig. 2. — Izofosfatazele electropozitive din formațiunile seminței de porumb în repaus :
a) ax embrionar ; b)scutel ; c)endosperm.

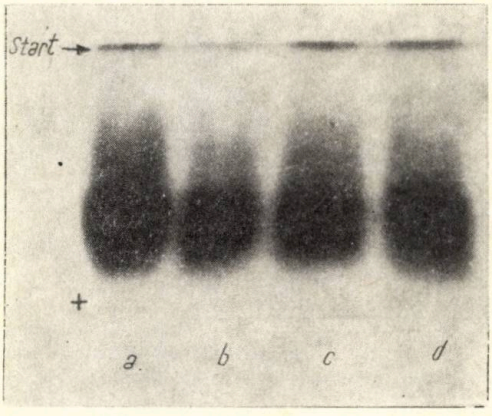


Fig. 3. — Izofosfatazele electronegative din frunzele de porumb la 11 zile:
(a), 13 zile (b), 15 zile (c) și 18 zile (d) de la semănare.

maximul în ziua a 6-a de germinare; activitatea de la 9 zile de germinare este mare comparativ cu cea de la 2 zile. Faptul că activitatea fosfatazică a organelor analizate atinge maximul în zile diferite de germinare poate fi corelat cu eliberări preferenţiale, în funcţie de necesităţile etapei respective, de radicali fosfat folosiţi în diverse cicluri metabolice.

Tabela 2

Activitatea fosfatazei acide din formaţiunile seminţei de porumb în cursul germinării
(ml folosiţi pentru dozarea fosforului eliberat = 6)

Formaţiunea seminţei	Zile de germinare	Raportul de extracţie g/ml	Cantitatea de extract folosită ml	γP
Ax embrionar	2	1/1	0,5	117
	4	,,	,,	154
	6	,,	,,	120
	9	,,	,,	110
Scutel	2	1/5	1	112
	4	,,	,,	189
	6	,,	,,	221
	9	,,	,,	157
Endosperm	2	1/1,5	2	28
	4	,,	,,	44
	6	,,	,,	60
	9	,,	,,	54
Suc vacuolar	4	—	0,5	152
	6	—	,,	131
	9	—	,,	73

Sucul vacuolar obţinut din plantule împreună cu restul seminţei la 4, 6 şi 9 zile de germinare, prezintă maximul activităţii fosfatazice la 4 zile ca şi în cazul axului embrionar, pentru ca în a 9-a zi activitatea fosfatazică din suc să scadă la jumătate (tabela 2).

Activitatea fosfatazei acide din extractele de frunze prezintă valori apropiate în intervalul de 11—18 zile de la semănare, pe cînd cea din sucul vacuolar scade treptat (tabela 3).

Tabela 3

Activitatea fosfatazei acide şi cantitatea de fosfor anorganic din frunzele de porumb în dezvoltare

Zile de la semănare	Extract		Suc vacuolar	
	Activitatea fosfatazei acide (0,5 ml extract, 6 ml alicot de supernatant)	Cantitatea pe P anorg. (γ/ml)	Activitatea fosfatazei acide (1 ml suc, 6 ml alicot de supernatant)	Cantitatea de P anorg (γ/ml)
11	95	460	85	300
13	100	530	76	376
15	96	570	56	276
18	95	610	52	264

Comparînd activitatea fosfatazică a plantulelor seminţelor germinate cu cea a frunzelor, se remarcă în ambele cazuri o scădere a activităţii enzimatice din sucul vacuolar o dată cu creşterea plantulei, respectiv a frunzei. Faptul că activitatea fosfatazei acide a extractelor de frunze rămîne aproape neschimbată în perioada cercetată, pe cînd aceea a sucului lor vacuolar scade, s-ar putea explica printr-o deplasare a locului de acţiune al acestei fosfataze din sucul vacuolar spre citoplasmă. Se explică astfel valorile apropiate ale activităţi fosfatazice a extractelor de frunze în perioada cercetată, cu toate că activitatea enzimatică a sucului vacuolar scade.

Activitatea fosfatazei acide din frunzele etiolate se situează în limitele valorilor activităţii frunzelor normale. Deci, activitatea fosfatazică faţă de β-glicerofosfat ca substrat nu depinde de prezenţa în frunze a acţiunii fotosintetizante.

Dinamica fosforului anorganic. Considerînd cantitatea de fosfor anorganic din axul embrionar al seminţei de porumb în repaus egală cu 100 pentru 1 g material, scutelul conţine 60%, iar endospermul doar 12%. Cantitatea de fosfor anorganic liber din sămînţă este de fapt rezultatul echilibrului dintre cantitatea eliberată din formele de depozitare ale acestuia (dintre care fitina deţine locul principal [6, b]), aportul din exterior şi utilizarea lui în formarea de substanţe noi, necesare metabolismului.

În cursul germinării, cantitatea de fosfor anorganic liber din plantulă scade (tabela 3), indicînd o preponderenţă a reacţiilor de biosinteză a constituenţilor fosforilaţi, ce pot participa apoi în diverse cicluri metabolice necesare plantulei în dezvoltare. Cantitatea de fosfor anorganic liber din tulpiniţă şi rădăcini în a 7-a zi de germinare este similară cu cea a plantulei şi egală pentru aceste două organe. În cazul scutelului, procesul de eliberare a fosforului anorganic este mai complex, constatîndu-se o acumulare maximă în a 6-a zi de germinare, corespunzător maximului activităţii fosfatazice (tabela 2). Scutelul este deci o formaţiune bogată în forme de depozitare a fosforului. Pînă în a 6-a zi de germinare procesele de eliberare hidrolitică a fosforului din substanţele de rezervă ale scutelului depăşesc pe cele de biosinteză a constituenţilor fosforilaţi.

Germinarea seminţei modifică puţin cantităţile mici de fosfor anorganic liber din endosperm. Cantitatea maximă de fosfor anorganic o conţine endospermul seminţelor germinate timp de 4—6 zile. Acest maxim corespunde celui al activităţii fosfatazice ; endospermul nu este o formaţiune bogată în forme de acumulare a fosforului.

Sucul vacuolar obţinut din seminţele germinate conţine cantităţi mari de fosfor anorganic. Dar, ca şi în cazul plantulei acestea scad cu cît germinarea înaintează.

Cantitatea de fosfor anorganic liber din extractele de frunze după 11, 13, 15 şi 18 zile de la semănare este foarte mare şi creşte cu vîrsta frunzei (tabela 3). Spre deosebire de acestea, cantitatea de fosfor din sucul vacuolar de frunze este mult mai mică, reprezentînd la 11 zile 2/3 din cea găsită în extract, pentru a creşte apoi la 13 zile şi a scădea din nou în perioada următoare.

Pentru a stabili dacă nu cumva cantitatea mare de fosfor anorganic decelată în extractele de frunze este rezultatul acţiunii fosfatazelor asupra substratelor tisulare proprii, am determinat fosforul anorganic după durate de extracţie diferite (10 min, 1 oră, 2 ore). În condiţiile noastre de lucru nu s-a observat o eliberare suplimentară de fosfor. Aceasta dovedeşte că extractul de frunze conţine cantităţi de fosfor cu mult mai mari decît

Tabela 4

Cantitatea de fosfor anorganic din formaţiunile seminţei de porumb în repaus

Formaţiunea seminţei	Raportul de extracţie g/ml	γP/ml de extract	γP/g material	%
Ax embrionar	1/10	72	720	100
Scutel	1/5	94	470	65
Endosperm	1/2	45	90	12

Tabela 5

Cantitatea de fosfor anorganic din formaţiunile seminţei de porumb în cursul germinării *

Formaţiunea seminţei	Zile de germinare	Cantitatea de apă %	Raportul de extracţie g/ml	γ/Pml extract	/Pg material
Ax embrionar	2	83,11	1/1	316	316
	4	90,39	,,	294	294
	6	91,97	,,	239	239
	9	91,16	,,	202	202
Scutel	2	50,30	1/5	106	530
	4	62,72	,,	122	610
	6	61,20	,,	202	1010
	9	64,21	,,	170	850
Endosperm	2	29,58	1/1,5	62	93
	4	33,57	,,	82	123
	6	41,40	,,	82	123
	9	53,06	,,	68	102
Suc vacuolar	4	—	—	340	340
	6	—	—	238	—
	9	—	—	176	—

* În tabel s-a dat şi cantitatea de apă din ţesutul analizat pentru a avea o vedere de ansamblu mai completă asupra datelor prezentate.

sucul vacuolar, rezultat ce concordă cu ipoteza unei deplasări a locului de acţiune al fosfatazei acide din sucul vacuolar în citoplasmă, pe măsura creşterii plantei.

CONCLUZII

1. — Fosfataza acidă din formaţiunile seminţelor de porumb în repaus sau după germinare, ca şi din frunză, se separă la electroforeza în gel de poliacrilamidă în 3—4 fracţiuni electronegative, în funcţie de organ şi perioada de vegetaţie; formaţiunile seminţei în repaus conţin însă şi 2—5 forme moleculare electropozitive.

2. — Schimbarea spectrului formelor moleculare ale fosfatazei acide în formaţiunile seminţei, o dată cu germinarea, are loc în primele două zile. După 4, 6 şi 9 zile de germinare se păstrează acelaşi aspect al enzimogramei de la 2 zile, remarcîndu-se doar diminuări sau intensificări ale activităţii unor fracţiuni.

3. — Frunzele conţin patru forme moleculare electronegative ale fosfatazei acide. Se păstrează acelaşi aspect al enzimogramei, indiferent de prezenţa sau absenţa procesului fotosintetic.

4. — În plantule şi frunze, formele moleculare ale fosfatazei acide se găsesc libere atît în sucul vacuolar cît şi în citoplasmă.

5. — Pe măsură ce germinarea avansează, activitatea fosfatazică a extractelor din organele seminţelor de porumb germinate creşte. Maximul activităţii fosfatazice a plantulelor se atinge după 4 zile de germinare, iar al scutelului şi endospermului după 6 zile.

6. — Activitatea fosfatazică şi cantitatea de fosfor anorganic din sucul vacuolar al seminţelor germinate scade însă pe măsură ce germinarea înaintează. Scutelul este un depozit de fosfor anorganic.

7. — În perioada cercetată, activitatea fosfatazică a extractelor din frunze rămîne practic constantă, pe cînd aceea a sucului lor vacuolar scade treptat.

8. — Cantitatea de fosfor anorganic din frunze creşte o dată cu vîrsta acesteia, pe cînd cea din sucul vacuolar scade. Aceasta ar conduce la ideea unei mobilizări a fosfatazei acide în citoplasmă.

Mulţumesc pe această cale tov. dr. Victoria Alexandrescu pentru indicaţiile preţioase date în elaborarea acestei lucrări.

Prezentat la redacţie la 30 iunie 1969

Institutul de biochimie
al Academiei
Republicii Socialiste România

BIBLIOGRAFIE

1. V. Alexandrescu, D. Popov, Rev. roum. Biochim., **6**, 105 (1969).
2. V. Jaaska, V. Jaaska, Izv. Akad. Nauk Estonskoi SSR-Biol., **17**, 274 (1968).
3. A. Nemek, Biochem. Zeitschr., **202**, 229 (1928).
4. F. A. Haskins, Biol-Abstr., **30**, 2796 (1956).
5. Ph. Matile, J. P. Balz, E. Semadeni, M. Jost, Zeitschr. f. Naturforsch., **20**, 693 (1965).
6. W. Ruhland, *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, (a) IV, 23 (1958); (b) IX, 228 (1958), Springer-Verlag, Berlin.
7. Porumbul, *Studiu monografic*, Edit. Acad. R.P.R., 1957, p. 147.
8. D. Tănăsescu, N. Moldoveanu, St. cerc. biochim., **11**, 315 (1968).
9. K. Hruska, Experienţia, **22**, 625 (1966).
10. R. Portocală, L. Popa, *Acizii ribonucleici celulari şi virali*, Edit. Acad. R.S.R., 1966, p. 318.
11. M. Enser, S. Shapiro, B. L. Horecker, Arch. Biochem. Biophys., **129**, 377 (1969),

THE ACID PHOSPHATASE AND THE INORGANIC PHOSPHORUS OF MAIZE IN THE FIRST GROWTH PHASES

SUMMARY

Two-theree electronegative and 2—5 electropositive phosphatase fractions against Na-β-glycerophosphate as substrate could be revealed in crude proteic extracts of maize seeds formations by a vertical system of 5% polyacrylamide gel electrophoresis in TRIS-EDTA. Na_2-H_3BO_3 buffer pH = 8.4. The change of enzymatic patterns takes place during the first 2 days of germination. The 2 day pattern is also maintained in the following days (until the ninth day) but some decreases or increases in the activity of some fractions could be observed. The leaves harvested after 11—18 days form the sowing, i.e. 8—15 days after sprout, reveal 4 electronegative molecular forms of acid phosphatase, unaffected by the presence or the absence of photosynthetic activity.

Acid phosphatase activity was measured in 0.2 M succinic acid-NaOH buffer pH = 6.2, during 30 min at 30°C.

The maximal activity of seedling is reached after 4 days of germination, and of the scutellum and endosperm after 6 days. The phosphorus amount of tissues follows the same variation. Scutellum is a storage of phosphorus.

The phosphatase activity of leaf extracts has similar values, but that of vacuolar juice gradually decreased. The amount of inorganic phosphorus increased with the age of leaves, while, that of vacuolar juice decreased. This is in agreement with a mobilization of acid phosphatase into the cytoplasm.

ST. CERC. BIOCHIM., 12, 4, 387–392 (1969)

CONȚINUTUL ÎN AMINOACIZI LIBERI (AAL) ȘI AMINOACIZI PROTEICI (AAP) AL UNOR HIBRIZI DE PORUMB ÎN COMPARAȚIE CU GENITORII LOR

FLAVIU ZETEA și CORNEL BODEA

Rezumat. — S-a determinat conținutul în AAL și AAP al boabelor de porumb la linii consangvinizate și la hibrizii acestora cu soiul Galben timpuriu. Conținutul în AAL al hibrizilor este superior ambilor genitori sau la nivelul genitorului mai bogat, în vreme ce conținutul în AAP este de cele mai multe ori intermediar celor doi genitori, dar mai apropiat liniei consangvinizate.

Cunoscută fiind importanța conținutului în protide al semințelor de cereale, ne-am propus să urmărim în acest studiu conținutul în AAL și AAP al unor hibrizi de porumb, comparativ cu liniile consangvinizate genitoare.

Cantitatea și compoziția calitativă a protidelor boabelor de porumb sînt influențate de o serie de factori ca: stimulatorii de natură organică [1], [2], temperatura [3], [4], pH-ul [5], [6], nutriția minerală [7], [8], ereditatea.

S-a stabilit că, la porumb, numărul genelor care participă la realizarea conținutului în substanțe proteice se ridică la 22 perechi, dintre care numai cîteva sînt principale, celelalte avînd o acțiune modificatoare [9].

Proteina endospermului de porumb purtător al genei „opaque-2" conține, comparativ cu porumbul normal, mai multă lizină, arginină, histidină, acid aspartic, glicină [10] și cantități reduse de zeină [11], iar cea a porumbului purtător al genei „floury-2" conține mai multă lizină și metionină [10]. Testele biologice au dovedit că proteina porumbului „opaque-2" este superioară tuturor proteinelor cerealelor cultivate pentru boabe, avînd un efect egal cu cel al făinii de soia [10].

MATERIAL ȘI METODĂ

S-a determinat conținutul în AAL și AAP al boabelor de porumb la 15 linii consangvinizate și la hibrizii acestora cu soiul Galben timpuriu (tabela 1). Materialul analizat a fost recoltat din culturi făcute în același loc în anul 1965 la Baza Experimentală a Institutului Agronomic din Cluj. Analizele au fost efectuate în perioada iulie-decembrie 1967.

Pentru determinarea AAL şi AAP s-a lucrat după metoda utilizată de T. Persecă şi A. Marinca-Roşca [12], astfel: 0,5 grame făină proaspăt măcinată s-au omogenizat la un omogenizator electric în soluţie de acid clorhidric 1%, s-au precipitat proteinele cu fosfowolframat de natriu şi s-a

Tabela 1

Liniile consangvinizate şi hibrizii lor cu soiul Galben timpuriu (7–9)♂

linia ♀	hibridul	linia ♀	hibridul	linia ♀	hibridul
211–212	569	124–126	555	13–14	725
58–60	724	457	690	392	678
303–305	659	40–41	546	280–281	597
22–24	727	122	554	408–409	686
318–320	661	25–27	728	274–276	584

centrifugat. Supernatantul filtrat s-a trecut pe o coloană cu răşină schimbătoare de ioni, Amberlit IR-120. Aminoacizii reţinuţi pe coloană s-au eluat cu o soluţie de amoniac 10%. Eluatul s-a evaporat la sec, iar AAL s-au reluat cu 0,5 ml izopropanol.

Din precipitatul proteic uscat la sec s-au luat probe de 0,2 grame, care au fost supuse hidrolizei acide (24 ore la 100°C, în HCl 6 N). Hidrolizatul s-a filtrat, s-a evaporat la sec, iar reziduul conţinînd AAP s-a reluat cu 0,5 ml izopropanol.

Din aceste extracte (păstrate la frigider) s-a utilizat la cromatografiere o cantitate de 0,08 ml din AAL şi 0,05 ml din AAP pentru fiecare spot. S-a folosit hîrtie Whatman nr. 1.

Irigarea cromatogramelor s-a făcut în sistemul n-butanol: acid acetic: apă (110 : 30 : 110), de două ori, ascendent, la temperatură constantă (22°C).

Pentru revelare, cromatogramele s-au pulverizat cu o soluţie de 0,2% ninhidrină în etanol 96%.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Conţinutul în AAL al hibrizilor, prezentat în tabela 2, este, în cele mai multe cazuri, superior ambilor genitori sau la nivelul genitorului mai bogat. Linia consangvinizată are un conţinut în AAL inferior atît soiului tester cît şi hibridului, cu excepţia alaninei, care în 13 cazuri apare în hibrid în cantităţi inferioare sau egale liniei consangvinizate, şi a asparaginei care într-un singur caz se găseşte în cantităţi aproximativ egale la cei doi genitori, ca şi la hibrid.

Lizina, metionina şi valina, consideraţi ca aminoacizi limitaţi în bobul de porumb [13], au o comportare diferită. În timp ce nivelul lizinei se apropie, cu o singură excepţie, de cel al genitorului mai bogat, pe care uneori îl depăşeşte (555, 728), metionina şi valina apar în hibrid în cantităţi net inferioare genitorului mai sărac, sau nu se evidenţiază de loc. Există o singură excepţie, la combinaţia hibridului 728, unde metionina şi valina

Tabela 2

Date comparative privind conținutul în AAL în funcție de mărimea și intensitatea culorii spoturilor *

spotul **	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
7—9	+	+	+	++	+	++	++	(+)	+	—
211—212	±	±	+	+	+	+	+	±	±	—
569	±	+	+	++	+	++	+	±	(+)	—
124—126	+	±	+	+	±	+	+	(+)	±	—
555	+	++	++	++	+	++	+	(+)	(+)	—
13—14	±	+	+	+	±	+	±	(+)	±	—
725	+	++	+	++	+	++	±	(+)	(+)	—
58—60	+	+	+	+	+	+	+	(+)	±	—
724	+	+	+	+	+	+	±	(+)	(+)	—
457	±	±	±	+	±	+	++	±	±	(+)
690	±	+	+	++	+	++	(+)	(+)	(+)	(+)
392	+	±	±	+	±	+	+	(+)	±	—
678	+	+	+	++	+	++	+	(+)	(+)	—
303—305	±	(+)	(+)	±	±	±	+	(+)	±	—
659	+	±	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	—
40—41	±	+	±	±	±	±	+	±	±	—
546	+	+	+	+	+	++	±	(+)	±	—
280—281	±	+	±	+	±	+	+	(+)	±	—
597	+	+	+	++	+	++	(+)	—	(+)	—
22—24	±	±	±	±	±	+	±	±	±	—
727	+	+	+	+	+	++	±	(+)	±	—
122	+	++	+	+	±	+	±	(+)	++	—
554	+	(+)	±	+	+	+++	—	—	(+)	—
408—409	±	±	±	+	±	+	+	(+)	±	—
686	±	+	+	++	++	++	(+)	(+)	(+)	—
318-320	±	±	±	+	+	+	+	(+)	±	(+)
661	±	±	±	++	++	++	(+)	±	—	(+)
25—27	±	±	±	+	+	+	+	(+)	±	—
728	+	+	+	++	+	++	++	(+)	±	—
274—276	±	±	±	++	±	+	±	(+)	±	—
584	+	±	±	++	+	++	++	(+)	—	—

* +++ = foarte intens colorat, ++ = intens colorat, + = mediu colorat, ± = slab colorat, (+) = foarte slab colorat, — = neevidențiat

** 1 = cisteină, 2 = lizină, 3 = histidină + arginină, 4 = asparagină + acid aspartic, 5 = serină + glicină, 6 = acid glutamic + treonină, 7 = alanină, 8 = prolină, 9 = metionină + valină, 10 = fenilalanină + leucină

Tabela 3

Date comparative privind conținutul în AAP în funcție de mărimea și intensitatea culorii spoturilor *)

spotul **)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
7—9	±	++	++	++	++	+++	+	++	±	++
211—212	(+)	+	±	±	±	+	±	±	(+)	+
569	(+)	++	+	+	+	++	±	+	(+)	+
124—126	±	++	+	++	+	++	±	(+)	±	+
555	±	++	+	+	+	+++	+	(+)	±	+
13—14	±	+	+	++	+	++	±	±	(+)	+
725	+	++	++	++	++	+++	+	++	±	+
58—60	±	++	++	+	+	++	+	+	±	++
724	±	++	++	±	++	++	±	+	(+)	+
457	±	++	++	++	+	++	±	±	±	+
690	±	++	+	++	++	+++	+	+	(+)	+
392	(+)	+	+	+	+	++	±	+	(+)	+
678	(+)	+	+	+	+	++	+	++	(+)	+
303—305	(+)	+	+	+	+	++	±	±	±	++
659	(+)	+	±	±	+	++	±	±	(+)	++
40—41	+	++	++	+	+	++	+	+	(+)	+
546	+	++	++	++	++	++	+	±	±	+
280—281	(+)	+	+	+	+	+++	+	++	(+)	+
597	±	++	+	±	+	+++	±	+	(+)	+
22—24	±	++	++	++	++	++	±	++	±	+
727	±	+	++	++	++	++	(+)	++	±	+
122	+	++	++	++	+	++	±	+	±	+
554	+	++	++	+++	++	+++	±	±	+	+
408—409	(+)	+	+	+	+	+++	±	++	(+)	++
686	(+)	+	±	±	+	++	(+)	++	(+)	++
318—320	(+)	+	+	+	+	+	±	+	(+)	+
661	±	++	+	+	+	++	±	+	±	+
25—27	±	+	++	++	+	+++	+	++	±	++
728	±	++	+	++	+	+++	±	+	±	+
274—276	±	+	++	++	++	+++	+	++	±	+
584	±	++	+	++	++	++	±	+	(+)	+

*) **) Aceeași legendă ca la tabela 2.

se regăsesc în hibrid în cantităţi aproximativ egale cu cele ale liniei consangvinizate. Conţinutul scăzut în valină este, de altfel, un caracter dominant [14].

Rezultatele analizelor conţinutului în AAP, prezentate în tabela 3, au evidenţiat că, din acest punct de vedere, linia consangvinizată este inferioară, rareori egală sau uşor superioară soiului tester. Hibrizii au de cele mai multe ori un conţinut intermediar celor doi genitori, dar mai apropiat liniei consangvinizate, sau chiar inferior acesteia. Numai în 3 cazuri (554, 690, 725) hibrizii au un conţinut mai apropiat de cel al soiului tester.

Conţinutul hibrizilor în lizină, metionină şi valină se găseşte la un nivel intermediar celor doi genitori, dar ceva mai apropiat, uneori uşor superior (728, 584) genitorului mai bogat în cazul lizinei, şi mai apropiat, frecvent inferior, genitorului mai sărac în cazul metioninei şi valinei.

Prin compararea conţinutului în lizină, metionină şi valină din AAL şi AAP se observă că, în raport cu genitorii, hibridul este proporţional mai bogat în lizină liberă decît în lizină proteică, şi mai sărac în metionină+ +valină liberă decît în metionină+valină proteică. Aceasta denotă că la hibrizi se transmite mai bine conţinutul ridicat în lizină liberă şi metionină+valină proteică şi mai puţin conţinutul ridicat în lizină proteică şi metionină+valină liberă.

Prezentat la redacţie
la 5 februarie 1969

Institutul agronomic „Dr. P. Groza"
Catedra de biochimie
Cluj

BIBLIOGRAFIE

1. M. Ioniţă şi colab., Institutul Agronomic Timişoara, Lucrări ştiinţifice, seria agronomie, **VIII**, 179—187 (1965).
2. M. Ioniţă şi colab., Institutul Agronomic Timişoara. Lucrări ştiinţitice, seria agronomie, **IX**, 187—196 (1966).
3. B. P. Tarlinskaia, O. P. Rodchenko, O. V. Kolmakova, L. G. Palşhina, Fiziol. Osn., 27—35, (1967), Chem. Abstr., **68**, 57441c (1968).
4. V. A. Yakovenkio, L. I. Isarova, Izv. Vyssh. Ucheb. Zaved. Pisch. Tekhnol., *6*, 22—25, (1966), Chem. Abstr., *67*, 54321m (1967).
5. N. D. Alekhina, S. S. Andreenko, Nauk. Dokl. Vyssh. Shk. Biol. Nauki, *4*, 181—187, (1966). Chem. Abstr., **67**, 17111x (1967).
6. S. S. Andreenko, N. D. Alekhina, Sel. skokhoz. Biol., **1**, *4*, 549—558, (1966), Chem. Abstr., **67**, 62701a (1967).
7. M. Saric, T. Cupina, I. Geric, Mededel. Landbowhogeschool Opzoekingssta Staat Gent, **30**, *2* 1045—1053 (1965), Chem. Abstr., **57**, 1024e, (1957).
8. P. P. Melinchuk, Fiziol. Biokhim. Osn. Pitan. Rast., Akad. Nauk Ukr. SSR, 1966, 12—17, Chem. Abstr., *67*, 32010c (1967).
9. T. Mureşan, *Bazele genetice ale ameliorării plantelor*, Ed. Agrosilvică, Bucureşti, 1967, 302—306.
10. E. T. Mertz, O. E. Nelson, L. S. Bates, O. A. Veron, Advan. Chem. Ser., **57**, 228—240 (1966).
11. S. A. Watson, K. R. Yahl, Cer. chem., **44**, *5*, 488—498 (1967).
12. T. Persecă, A. Marinca-Roşca, Studia Univ. Babeş-Bolyai, Cluj, *1*, 137—142 (1966).
13. G. Piva, Maydica, *X*, *2*, 51—62, (1965).
14. R. W. Jugenheimer, *La selection des maïs hybrides et la production de semences*, Roma, 1959.

THE FREE (FAA) AND PROTEIN AMINO ACID (PAA) CONTENT OF SOME MAIZE HYBRIDS AS COMPARED TO THEIR GENITORS

SUMMARY

FAA and PAA content of maize grains was determined in consanguinized lines as well as in their hybrids with the early yellow sort.

FAA content of hybrids is higher than in both genitors, or in the richer genitor; in most cases PAA content shows intermediate values between the two genitors, but closer to the consanguinized line.

ST. CERC. BIOCHIM., 12 4, 393–396 (1969)

NOTĂ DE LABORATOR

DISPOZITIV PENTRU TURNAREA PLĂCILOR DE POLIACRILAMIDĂ UTILIZATE ÎN ELECTROFOREZA ACIZILOR NUCLEICI ŞI A PROTEINELOR

S. VASU

Rezumat. — Se prezintă un dispozitiv pentru turnarea plăcilor de poliacrilamidă pe suport de sticlă. Dispozitivul este simplu şi permite obţinerea gelurilor de poliacrilamidă de concentraţii mici sau mari, continue sau discontinue, în care pot fi supuse la electroforeză simultan mai multe probe de acizi nucleici sau de proteine. Construcţia dispozitivului se bazează pe aderenţa diferită a poliacrilamidei pe sticlă şi plexiglas şi este astfel concepută încît să se asigure continuitatea gelului pe toate dimensiunile plăcii şi totodată ştanţarea „starturilor" pentru aplicarea probelor.

În fracţionarea electroforetică a acizilor nucleici, în special a celor cu greutate moleculară mare, s-a arătat [1], [2], [3] în ultimii doi ani că cele mai bune geluri de poliacrilamidă sînt cele cu porozitate mare, respectiv gelurile diluate obţinute prin polimerizarea unor soluţii de monomeri de concentraţie relativ mică. Se ştie însă că aceste geluri diluate sînt fragile şi greu de manipulat; se întîmpină dificultăţi la scoaterea gelurilor din matriţa în care s-a produs polimerizarea, la mînuirea lor pentru colorare, decolorare, secţionare sau tăiere etc. Se întîmpină dificultăţi la însăşi polimerizarea soluţiilor diluate de monomeri [1].

Luînd în considerare pe de o parte dificultăţile menţionate şi, pe de altă parte, ţinînd seama de bine cunoscutele avantaje pe care le prezintă în fracţionarea electroforetică gelurile de poliacrilamidă de formă paralelipipedică, faţă de cele cilindrice [4] — [7], am construit un dispozitiv pentru turnarea plăcilor de poliacrilamidă pe suport de sticlă.

Construcţia acestui dispozitiv se bazează pe aderenţa diferită a poliacrilamidei faţă de sticlă şi plexiglas şi este astfel concepută încît să asigure continuitatea gelului pe toate dimensiunile plăcii şi totodată ştanţarea „starturilor" pentru aplicarea probelor; faţă de volumul efectiv al gelului, pentru umplerea dispozitivului este necesar un mic surplus (de cca. 2 ml) de amestec care polimerizează.

După polimerizare, gelul este uşor desprins de pe plexiglas şi aderă bine de suprafaţa sticlei, ceea ce permite să fie mînuit cu uşurinţă.

Descrierea dispozitivului. Dispozitivul pentru turnarea plăcilor de poliacrilamidă, prezentat în figura 1, constă din:

a) o placă din plexiglas (*1*) de 186 × 130 × 5 mm, de care sînt lipite pe lungimea lor patru bucăţi paralelipipedice din plexiglas (*2*, *3*, *4* şi *5*) de

30×2×10 mm şi şase bucăţi paralelipipedice din plexiglas (*6*, *7*, *8*, *9*, *10* şi *11*) de 12×2×2 mm;

b) două piese paralelipipedice din plexiglas (*12* şi *13*), una (*12*) de 108×5×3 mm şi alta (*13*) de 112×5×3 mm;

c) două piese paralelipipedice din plexiglas (*14* şi *16*) de 200×10×2 mm;

d) o placă de sticlă (*15*) de 160×110×2 mm.

Montarea dispozitivului şi turnarea gelului. Placa de plexiglas (*1*) se aşează orizontal; în felul acesta anexele lipite de ea vor fi perpendiculare pe placă.

Se ataşează părţile mobile din plexiglas; piesa *14* sprijinită de *4* şi *5*, pentru delimitarea gelului în lungime, şi piesele *12* (sprijinită de *2* şi *3*) şi *13* pentru delimitarea în lăţime.

Deasupra pieselor *12* şi *13* se plasează placa de sticlă *15*.

Amestecul de monomeri (acrilamidă-bisacrilamidă) cu adausul de catalizatori (NNN'N'-tetrametiletilendiamină şi persulfat de amoniu) * se toarnă între cele două plăci *1* şi *15*. Turnarea acestui amestec se realizează folosind o placă de sticlă sprijinită cu o latură pe placa de plexiglas, încît să formeze un plan înclinat cu un unghi de cca 20—30°.

După turnarea amestecului, dispozitivul este închis ataşînd piesa *16*; în felul acesta se întrerupe contactul cu aerul, iar amestecul de monomeri se polimerizează. Timpul necesar pentru polimerizare depinde de concentraţia monomerilor. După trecerea acestui timp, cu ajutorul unei lame de ras se detaşează piesele *16* şi *14*; dispozitivul este inversat, cu placa de sticlă în jos; se introduce un capăt al lamei de ras între placa de plexiglas *1* şi piesa *12*, iar printr-o uşoară apăsare gelul se desprinde de pe placa de plexiglas, rămînînd ataşat de placa de sticlă. Tot cu ajutorul lamei de ras se îndepărtează apoi piesele *12* şi *13*.

Placa de gel astfel obţinută este de formă paralelipipedică, de 150×110×3 mm; în ea rămîn bine demarcate „starturile", respectiv 6 adînciturі de 12×2×2 mm. Datorită diferenţei de 1 mm dintre grosimea gelului (3 mm) şi adîncimea „starturilor" (2 mm), se asigură continuitatea gelului de poliacrilamidă pe suprafaţa sticlei, iar probele supuse electroforezei pot fi aplicate sub formă de soluţie. Plăcile astfel obţinute sînt utilizate pentru electroforeza orizontală.

Legătura între placa de poliacrilamidă şi tamponul de electroforeză se realizează, la cele două capete, prin cîte două bucăţi de hîrtie de filtru Whatman — una introdusă între placa de sticlă şi cea de poliacrilamidă, iar a doua deasupra plăcii de poliacrilamidă, pe o distanţă de cca 1 cm. Pentru evitarea evaporării în timpul electroforezei, placa de poliacrilamidă este acoperită cu o foaie de polietilenă.

Pentru a ilustra separările electroforetice obţinute pe astfel de geluri, redăm în figura 2 fotografia unei plăci de poliacrilamidă 3,5% în care s-au supus electroforezei acizii ribonucleici (ARN) din Aspergillus niger, fracţionaţi prin gel filtrare pe Biogel P—100. Prin gel filtrare pe Biogel P—100, ARN sînt separaţi în două piscuri [9]; placa fotografiată cuprinde ARN

* Pentru electroforeza acizilor nucleici preparăm gelurile de poliacrilamidă după indicaţiile date de N. E. Loening [1], A. C. Peacock şi C. W. Dingman [2], iar pentru proteine după R. Holmes [6] sau T. Akroyd (7).

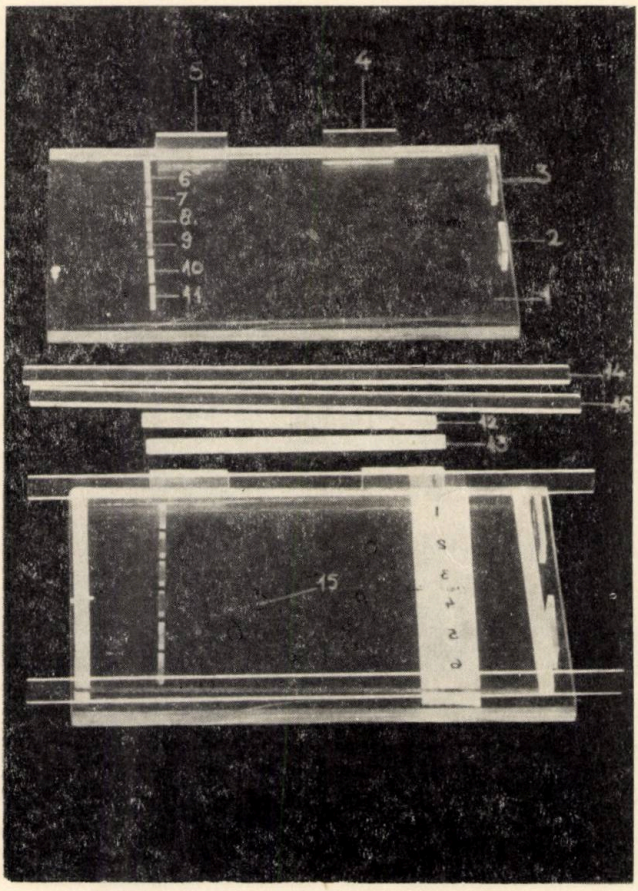


Fig. 1. — Dispozitiv pentru turnarea plăcilor de poliacrilamidă.

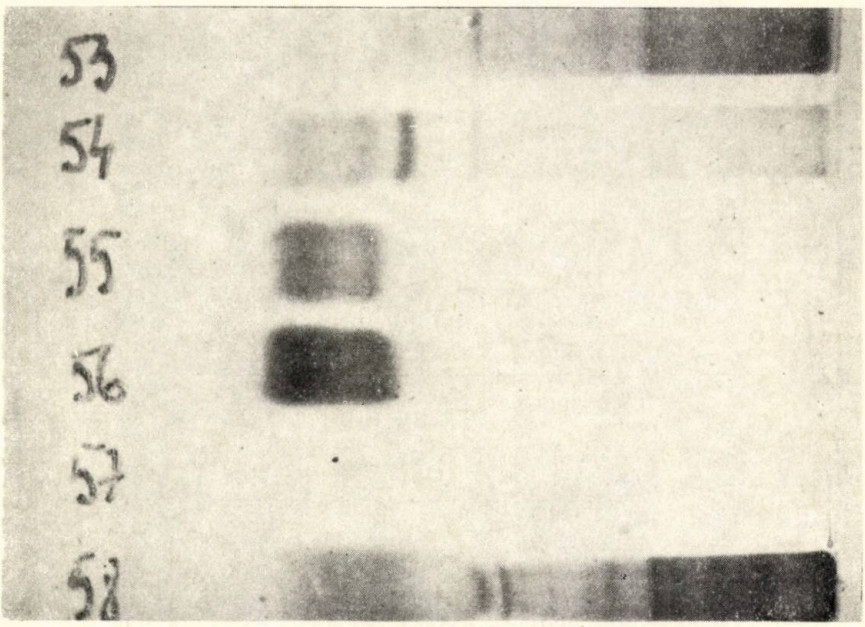


Fig. 2. — Electroforeza ARN din Aspergillus niger fracţionaţi prin gel filtrare pe Biogel P—100 (gel de poliacrilamidă 3,5%; ARN coloraţi cu albastru de toluidină; 53 — fracţiunea care marchează sfîrşitul primului pisc; 54, 55 şi 56 — fracţiuni din al doilea pisc; 58 — martor nesupus gel filtrării).

dintr-o fracţiune care marchează sfîrşitul primului pisc, trei fracţiuni din piscul al doilea şi un martor nesupus gel filtrării.

Dispozitivul prezentat în figura 1 poate fi utilizat şi pentru obţinerea plăcilor de poliacrilamidă de dimensiuni mai mici, pentru una sau două, pînă la cinci probe. În aceste cazuri, corespunzător cu lăţimea plăcilor de sticlă, se micşorează lungimea pieselor *12* şi *13*.

În mod curent folosim dispozitivul menţionat pentru turnarea plăcilor de poliacrilamidă de concentraţii continue sau uniforme, de 3% sau mai mari de 3%; pentru concentraţii mai mici, de 2—3% monomeri realizăm polimerizarea în condiţiile arătate de J. Uriel [6], A.C. Peacock şi C.W. Dingman [8] în prezenţă de 0,5% agaroză.

Dispozitivul prezentat poate fi folosit de asemenea pentru turnarea plăcilor de concentraţii discontinue în poliacrilamidă. În acest caz este suficient de a introduce între placa de plexiglas (*1*) şi cea de sticlă (*15*) încă o piesă de plexiglas, similară cu piesa *13*. Această piesă, dispusă paralel între piesele *12* şi *13*, perpendicular pe *14*, va compartimenta dispozitivul în două. Astfel, în cazul electroforezei acizilor nucleici, dispozitivul poate fi împărţit în două compartimente de aceeaşi mărime; în compartimentul care conţine matriţele „starturilor" se toarnă gelul de concentraţie mică (de ex. 3% monomeri), iar după gelificarea acestuia, scoţînd piesa despărţitoare, se toarnă în cel de al doilea compartiment amestecul de monomeri de 6%. În felul acesta, prin electroforeză, în prima porţiune a gelului vor fi fracţionate speciile moleculare de greutate moleculară mare (ADN, ARN ribozomali), iar în a doua porţiune — cele de greutate moleculară relativ mică.

În cazul fracţionării electroforetice a proteinelor, introducînd piesa despărţitoare la cca 1 cm de la matriţele „starturilor" (către mijlocul dispozitivului), în compartimentul mic se toarnă gelul diluat (de ex. 5%), realizîndu-se ceea ce se numeşte „gelul de concentrare", iar în al doilea compartiment mare se toarnă gelul concentrat (de ex. 7,5%), obţinîndu-se „gelul de fracţionare". Se ajunge astfel la plăci de concentraţii discontinue în poliacrilamidă, întru totul asemănătoare celor descrise de R. Holmes [7], însă în condiţii cu mult mai simple decît cele utilizate de autorul citat.

Prezentat la redacţie la 6 iunie 1969

Institutul de biochimie
al Academiei
Republicii Socialiste România

BIBLIOGRAFIE

1. N. E. Loening, Biochem. J., **102**, 251 (1967).
2. A. C. Peacock, C. W. Dingman, Biochemistry, **6**, 1818 (1967).
3. H. R. Maurer, *Disk-Elektrophorese*, Walter de Gruyter & Co., Berlin, 1968.
4. S. Raymond, Ann. N. Y. Acad. Sci., **121**, 350 (1964).
5. J. Uriel, Bull. Soc. Chim. Biolog., **48**, 969 (1966).
6. R. Holmes, Biochim. Biophys. Acta, **133**, 174 (1967).
7. P. Akroyd, Analyt. Biochem., **19**, 399 (1967).
8. A. C. Peacock, C. W. Dingman, Biochemistry, 7, 668 (1968).
9 S. Vasu, Ş. Hulea, date nepublicate.

DEVICE FOR POURING POLYACRYLAMIDE PLATES USED IN NUCLEIC ACID AND PROTEIN ELECTROPHORESIS

SUMMARY

A device for pouring polyacrylamide plates on glass support is described. It is very simple and can be used for obtaining polyacrylamide gels of low and high, respectively, continuous and discontinuous concentrations, in which many samples of nucleic acids or proteins can be concomitantly separated by electrophoresis. The construction of the device is based upon the different adherence of polyacrylamide to glass and to plexiglass. It is conceived so that the places where samples are applied, remain well marked in the gel and at the same time the continuity of the lather on the whole plate sizes is ensured.

În cursul anului 1968, activitatea desfăşurată de Subcomisia de Biochimie a Academiei R. S. România, Filiala Iaşi, a fost următoarea :

S-au ţinut trei şedinţe, la care au fost prezentate trei referate generale, privind hexokinaza, hipoxia cauză de malignizare şi modificările pH-ului intramitocondrial sub acţiunea ionilor de Ca, precum şi 6 comunicări axate pe rezultatele obţinute de cercetătorii şi cadrele didactice din Institutul de Medicină, Institutul Agronomic şi Institutul de Cercetări Medicale al Academiei R. S. România, şi anume :

1. Permeabilitatea reticulocitară la ionii de ^{45}Ca
2. Fosforilarea oxidativă în mitocondriile ficatului de şobolan în carenţă biotinică.
3. Actualităţi în aprecierea valorii amoniemiei
4. Influenţa cistaminei asupra respiraţiei şi glicolizei la reticulocite
5. Influenţa ionilor de Ca şi Mg asupra activităţii unor enzime
6. Mecanisme de reglare a activităţii glutamat dehidrogenazei din eritrocite.

Institutul de Cercetări Medicale al Academiei R. S. România şi Catedra de Biochimie de la Institutul de Medicină şi Farmacie au participat la Congresul European de Biochimie de la Praga, din iulie 1968, printr-un număr de 10 cercetători, care au prezentat 12 lucrări ştiinţifice.

AL VI-LEA CONGRES FEBS

Între 4 şi 7 aprilie a.c. s-au desfăşurat la Madrid lucrările celui de-al VI-lea Congres al Federaţiei Europene a Societăţilor de Biochimie (FEBS). Această prestigioasă manifestare ştiinţifică a reunit peste 2.500 de biochimişti, printre care s-au aflat şi opt laureaţi ai Premiului Nobel, alături de numeroase alte personalităţi marcante în domeniul biochimiei. Dar amploarea acestui congres apare evidentă şi din cele peste 1.200 de lucrări ştiinţifice prezentate în conferinţe plenare, simpozioane, colocvii, sub formă de aşa-zise comunicări libere şi demonstraţii.

Tematica congresului a fost extrem de variată, abordînd probleme fundamentale ale biochimiei contemporane ; ea s-a circumscris următoarelor aspecte majore : biosinteza macromoleculelor (structura şi funcţia ribozomilor, transcrierea mesajului genetic, morfogeneza virusurilor), reglarea metabolică (controlul expresiei genetice, gluconeogeneza şi alte căi metabolice, enzime interconvertibile), mecanisme de acţiune ale enzimelor (centri activi, modularea activităţii enzimatice), structura şi funcţia membranelor, biochimie evolutivă, biologia molecs ulară a diferenţierii, neurobiologie moleculară, enzimopatologie, bazele moleculare ale acţiunii antibiotice. În două conferinţe plenare s-a abordat problema organizării intracelulare a căilor de biosinteză (F. Lynen) şi cea a informozomilor (A. Spirin), iar comunicările înscrise au tratat nu mai puţin de 28 de domenii ale biochimiei.

Din această tematică deosebit de variată, se pot contura însă cel puțin două aspecte deosebite, care au polarizat atenția participanților: biosinteza macromoleculelor, cu referire specială la inițierea și elongația catenelor polipeptidice, și structura și rolul centrilor activi implicați în mecanismul activității enzimatice.

La acest congres au fost înscrise și o serie de lucrări ale biochimiștilor din țara noastră, dintre care cîteva, prezentate de către autorii lor, au fost bine apreciate.

În cadrul congresului au fost organizate și două expoziții: una de cărți, în care marile edituri din Europa și S.U.A. au prezentat cele mai recente apariții în domeniul biochimiei și în domeniile conexe, și alta de aparatură, în care s-au expus instrumente din cele mai moderne, pentru investigații de mare finețe în biochimia analitică.

Al VI-lea Congres FEBS a constituit o importantă manifestare științifică nu numai prin amploarea și organizarea sa, dar și prin posibilitatea realizării unor legături și contacte extrem de utile, soldate cu schimb de idei și de informare științifică. În aceasta constă, de altfel, unul din țelurile principale înscrise în Statutul FEBS.

Conform hotărîrii celui de al 9-lea Consiliu FEBS, care s-a întrunit înainte de deschiderea oficială a Congresului pentru dezbaterea activității sale multilaterale, și a reunit reprezentanții celor 24 de societăți și comisii de biochimie afiliate, s-a stabilit ca viitorul Congres FEBS să se desfășoare în anul 1971, la Varna, în R. P. Bulgaria

Dr. *Mihail Șerban*
Institutul de biochimie
al Academiei Republicii Socialiste România

CURSUL PRACTIC DE VARĂ „METODE DE ANALIZĂ IMUNOCHIMICĂ"

Între 23—28 iunie 1969 a avut loc la Institutul de biochimie al Academiei R. S. România un curs de imunochimie, organizat de Sectorul de Imunochimie al acestui institut.

Cursul a fost alcătuit din lucrări practice, prelegeri și demonstrații și a fost urmat de 32 de cursanți din București și provincie, proveniți de la institute de cercetare, catedre universitare și laboratoare clinice.

Lucrările practice au avut următoarea tematică: 1. Utilizarea imunosorbenților la determinarea cantitativă a anticorpilor și la izolarea și purificarea lor (D. Cilievici); 2. Electroforeza în gel de poliacrilamidă, aplicată la fracționarea serului sanguin uman și la testarea eterogenității lanțurilor „ușoare" provenite din IgG de iepure (D. Cilievici); 3. Tehnici de identificare aplicate în imunoelectroforeza serului sanguin uman (L. Buzilă); 4. Cromatografia de schimb ionic aplicată la izolarea și purificarea IgG de iepure (S. Mihăescu); 5. Imunodifuzia cantitativă (pentru dozarea IgG și IgA din serul sanguin uman) (C. Motaș); 6. Aplicarea gelfiltrării la separarea IgM de IgG din serul sanguin uman și la izolarea lanțurilor „grele" și „ușoare" din molecula IgG de iepure (S. Mihăescu); 7. Marcarea anticorpilor cu izotiocianat de fluoresceină și efectuarea coloratiei imunofluorescente pentru detectarea celulelor din splină ce sintetizează IgG (R. Lenkei, Institutul Babeș).

Prelegerile au fost consacrate unor aspecte teoretice ale analizei imunochimice, ca: 1. Prepararea antigenelor și criterii de alegere a schemelor de imunizare (V. Gheție); 2. Izolarea

și purificarea anticorpilor (C. Motaș) și 3. Testarea antiserurilor prin reacția de imunoprecipitare (D. Cilievici).

Demonstrațiile au cuprins: 1. Cromatografia și imunocromatografia în strat subțire (C. Dragomirescu) și 2. Perfuzia organelor și metode de extracție a unor antigene tisulare (C. Medeșan).

Cursanții au audiat și o conferință despre rolul acizilor nucleici în imunitate (Gr. Ghyka, Institutul Cantacuzino).

Cursurile s-au încheiat cu o masă rotundă, la care s-au discutat metodele de lucru folosite și modul de interpretare a rezultatelor.

T. DEVENYI şi J. GERGELY, *Analytische Methoden zur Untersuchung von Aminosäuren Peptiden und proteinen* (Metode analitice pentru cercetarea aminoacizilor, peptidelor şi proteinelor), Akademiai Kiado, Budapesta 1968, 347 p., 71 fig.

În lucrarea de faţă autorii prezintă principalele metode folosite în studierea proteinelor. În ultimii 20 de ani, chimia proteinelor s-a dezvoltat deosebit de repede, datorită perfecţionării metodelor de analiză, dar mai ales datorită introducerii unor metode noi, şi anume a metodelor cromatografice, electroforetice, imunochimice.

Primul capitol al lucrării oferă o privire de ansamblu asupra aplicării metodelor electroforetice, cromatografice şi imunochimice în cercetarea proteinelor native. Stabilirea secvenţei aminoacizilor din proteine şi peptide implică hidroliza lor chimică sau enzimatică, urmată de fracţionarea amestecurilor obţinute. Pentru stabilirea aminoacizilor N-terminali ai peptidelor se folosesc metodele lui Sanger şi Edman. Metoda chimică cea mai importantă pentru determinarea aminoacizilor C-terminali şi peptidelor este hidrazinoliza.

Capitolele următoare tratează mai pe larg metodele menţionate, prezentînd principiul fiecărei metode, domeniul ei de aplicabilitate, aparatura şi substanţele necesare, cît şi modul de lucru. Astfel, capitolele II şi III se ocupă de descrierea electroforezei pe hîrtie, folosind tensiune joasă sau înaltă. Capitolul IV prezintă metodele imunochimice de analiză, adică imunodifuzia, imunoelectroforeza, difuzia cantitativă în gel, imunodifuzia pe membrane de acetat de celuloză. Capitolul V tratează cromatografia de partiţie, de schimb ionic şi de excludere moleculară. Capitolele VI—IX se ocupă de descrierea metodelor de hidroliză a proteinelor şi peptidelor, de determinarea aminoacizilor N- şi C-terminali, cît şi de concentrarea şi determinarea cantitativă a proteinelor.

În ultima parte a lucrării e prezentată tehnica cromatografiei în fază gazoasă, aplicată la aminoacizi şi peptide.

Fiecare capitol e însoţit de o bogată bibliografie, cuprinzînd atît monografiile existente în domeniul respectiv cît şi lucrările cu preocupări mai speciale.

Prezentarea critică a metodelor menţionate, ilustrarea lor prin rezultate înscrise în 18 tabele şi 71 figuri, indicaţiile practice privind folosirea aparaturii şi modul de lucru, fac din această lucrare un îndreptar util pentru laborator.

Doina Cilievici
Institutul de biochimie
al Academiei Republicii Socialiste România

Progress in the chemistry of fats and other lipids (Progrese în chimia grăsimilor şi a altor lipide), Editor Ralph T. Holman, Vol. X, Partea a 3-a, Pergamon Press, Londra, 1969, 86 p.

Acest volum face parte dintr-o serie de publicaţii avînd drept scop prezentarea ultimelor date privind compoziţia, biochimia şi fiziologia lipidelor.

Perfecţionarea continuă a metodelor de analiză a dus la recunoaşterea faptului că majoritatea lipidelor naturale cuprind cantităţi mai mari sau mai mici de constituenţi noi, cum sînt lipidele diolice şi eterice, care fac obiectul acestei cărţi.

Primul articol, semnat de L. D. Bergelson de la Institutul pentru chimia compuşilor naturali din Moscova, are drept obiect categoria de constituenţi celulari numită lipide diolice, a căror particularitate structurală este aceea de a cuprinde unii dialcooli inferiori, ca etilenglicolul, propandiolul, butandiolul. După prezentarea procedeelor de separare şi de identificare, autorul discută metabolismul şi rolurile fiziologice probabile ale lipidelor diolice.

Al doilea articol din acest volum, semnat de Fred Snyder de la Universitatea din Oak Ridge, Tennessee, tratează biochimia lipidelor care cuprind legături eterice. Pe lîngă plasmalogenele cunoscute de multă vreme, în anii din urmă au fost identificate în ţesuturile animale şi în microorganisme şi alte lipide eterice, mono- şi dialchil-gliceril eteri, alchenil-acilfosfatide. După menţionarea efectelor farmacologice şi terapeutice, în ultima parte sînt prezentateunele date privind biosinteza şi catabolismul lipidelor eterice.

Prin materialul nou şi competenţa autorilor, volumul este preţios pentru cei angajaţi în studiul biochimiei lipidelor.

Dr. *Elena Cristea*
Catedra de biochimie I.M.F. Bucureşti

MICHAEL ARNOLD *Histochemie, Einführung in Grundlagen und Prinzipien der Methoden* (Histochimia. Introducere în bazele şi principiile metodei), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1968, 211 p., 68 fig.

Manualul a fost întocmit pe baza consultării unor monografii, manuale şi periodice şi a unui mare număr de lucrări originale.

După o amplă introducere în care se dau unele recomandări în legătură cu posibilităţile de aplicare a metodei histochimice, se face comparaţia cu metodele histologice şi biochimice, se arată avantajele acestei metode şi sursele ei de eroare, se trece la prezentarea bazelor metodei histochimice în sensul că se arată mersul reacţiilor, formarea produşilor coloraţi în reacţiile omogene şi eterogene, mecanismul şi calculul absorbţiei în lumina albă, monocromatică şi ultraviolet etc. După aceste consideraţii teoretice, care fac obiectul primelor două capitole, se trece la partea propriu-zis practică, care, la rîndul ei, nu se limitează numai la indicaţiile practice şi metode de lucru (reţete), ci conţine şi ea un bogat material teoretic, specific fiecărui mod de prelucrare a obiectului.

Astfel, în capitolul III (subcap. A—G) se indică modul de prelucrare a materialului: uscare prin îngheţare, îngheţarea şi tăierea cu ajutorul criostatului, tăierea cupelor fără îngheţare, fixarea chimică, asupra căreia se insistă mai mult, deoarece trebuie să îndeplinească o

serie de condiții, ca : menținerea intactă a structurii componentelor, a pH-ului și a tonicității celulei etc.

Următorul capitol (IV), „reacțiile histochimice", începe cu expunerea posibilităților de exprimare a rezultatelor, care trebuie să îmbine atît latura calitativă cît și cea cantitativă, și continuă cu indicarea tuturor compușilor și enzimelor care se pot decela prin metoda histochimică.

Se arată apoi modul de formare a complexelor colorate, ca : formarea pigmentului pe seama substratului, pe seama reactivului, formarea prin legarea reactivului de substratul nemodificat, de substratul modificat, colorarea prin solvire, prin preluarea de anumite sarcini electrostatice, prin formarea de complexe cu săruri metalice, prin marcarea cu substanțe radioactive etc.

Întreg acest capitol este ilustrat cu fotografii la microscopul electronic, autoradiografii, grafice, scheme ; se dau și formule structurale ale diferiților compuși și chiar mersul reacțiilor.

Următorul capitol (V) cuprinde indicații practice de lucru, printre care se menționează : mijloace de fixare și metode de includere a materialului, reacții de control (desaminări, extracții, blocări, reduceri, oxidări), lista de substanțe care pot fi identificate și reacțiile respective. Capitolul sfîrșește cu prezentarea unor tabele de mare utilitate ca : substanțele folosite în prepararea soluțiilor tampon, cu indicația autorului, a domeniilor de pH, precum și a modului de preparare ; diferite constante fizice, ca : solubilitățile unor compuși anorganici, organici, constanta dielectrică a unor solvenți, indicele de refracție și medii de includere, molaritatea acizilor și bazelor, tabele de transformare a unor unități de măsură (lungime, suprafață, volum, greutate) etc.

Manualul este completat cu o bogată bibliografie.

Datorită caracterului său didactic, acest manual poate folosi unui cerc larg de specialiști care doresc să utilizeze metoda histochimică pentru problemele speciale de cercetare.

Viorica Frunzeti-Eleferescu
Institutul de biochimie
al Academiei Republicii Socialiste România

SUBCELULLAR COMPONENTS, PREPARATION AND FRACTIONATION (Componentele subcelulare, preparare și fracționare), editată de G. D. Birnie și S. M. Fox, Editura Butterworths, London, 1969, 173 p.

Cartea prezintă lucrările simpozionului ținut în noiembrie 1967 avînd ca temă titlul enunțat. Avînd în vedere aplicarea pe o scară din ce în ce mai largă a separării formațiunilor intracelulare, simpozionul și-a propus să încerce să răspundă la cele două întrebări majore care se ridică în această problemă : 1) cum poate fi tratat un țesut astfel ca să se obțină maximum de celule sfărîmate cu minimum de degradare a formațiunilor subcelulare, 2) ce criterii să se aplice, pentru a se judeca puritatea și integritatea formațiunilor obținute. Sînt prezentate metodele clasice de separare pentru a se putea discuta avantajele și neajunsurile lor. Astfel, B. D. Roodyn a prezentat metodele de izolare a nucleilor din țesutul animal, J. B. Chappell și R. Hansford, metodele de preparare a mitocondriilor, J. R. Tata, metodele de sepa-

rare a microzomilor şi fracţiunilor submicrozomale precum şi proprietăţile lor, H. R. V. Arnstein, izolarea polizomilor şi ribozomilor, K. S. Kirby şi colab. separarea RNA ribozomal şi W. G. Flamm şi colab. prepararea şi fracţionarea DNA prin ultracentrifugare isopicnică. De remarcat prezentarea unei noi metode de omogenizare a ţesuturilor animale prin presiune (P. J. G. Avis).

Avînd în vedere importanţa crescîndă a centrifugării în gradient de densitate, editorii au adăugat un capitol de separare a polizomilor, ribozomilor şi subunităţilor ribozomale prin centrifugare în gradient de densitate.

Discutarea din cînd în cînd în cadrul unor simpozioane a metodelor folosite împrospătează cunoştinţele, evită rutina, confruntă erorile. Prezentarea în volum a metodelor şi a discuţiilor este de un real folos tuturor biochimiştilor, biologilor sau medicilor din ori ce domeniu.

Cecilia Motaş
Institutul de biochimie
al Academiei Republicii Socialiste România

BIOCHEMICAL ASPECTS OF THE BIOGENESIS OF MITOCHONDRIA (Aspecte biochimice ale biogenezei mitocondriilor) sub îngrijirea lui E. C. Slater, J. M. Tager, S. Papa şi E. Quaqliariello, Adriatica Editrice, 1968, 494 p.

A devenit o tradiţie ca Universitatea din Bari să organizeze anual o masă rotundă asupra mitocondriilor şi să publice cu promptitudine atît lucrările cît şi discuţiile. În 1967 subiectul mesei rotunde a fost : „Aspecte biochimice ale biogenezei mitocondriilor". Au participat oameni de ştiinţă care lucrează în această direcţie ca : P. Borst, A. M. Kroon, E. C. Slater şi J. M. Tager de la Universitatea din Amsterdam, A. W. Linnane de la Clayton, Australia, T. S. Work de la Institutul de cercetări medicale din Londra, F. K. Bygrave şi W. Neupert de la Universitatea din München, gazdele, S. Papa şi E. Quaqliariello de la Universitatea din Bari şi alţii. Comunicările s-au concentrat pe următoarele teme : dovezi histochimice pentru existenţa acizilor nucleici mitocondriali, proprietăţile DNA mitocondrial izolat, biosinteza şi degradarea DNA mitocondrial (studii *in vitro* şi sinteza DNA în mitocondriile izolate), proprietăţile RNA mitocondrial izolat, biosinteza RNA mitocondrial, experienţe de hibridizare cu DNA şi RNA mitocondrial, sinteza proteinelor mitocondriale, aspecte genetice : tipuri de mutaţii care implică funcţia şi morfologia mitocondrială, procedee practice pentru izolarea preparatelor mitocondriale potrivite pentru studiul macromoleculelor mitocondriale şi cu contaminări minime de alte fracţiuni celulare sau bacterii.

Cu totul remarcabile sînt discuţiile. Publicarea acestora arată nivelul lucrărilor, importanţa şi seriozitatea lor. Marea controversă în acest domeniu este aceea a eventualei contaminări a preparatelor mitocondriale cu bacterii.

Cecilia Motaş
Institutul de biochimie
al Academiei Republicii Socialiste România

Progress in Phytochemistry (Progrese în fitochimie), vol. 1, editat de L. Reinhold, Y. Liwschitz., Interscience Publishers. John Wiley and Sons, London, New York, Sidney, 1968, 723 p.

Alături de numeroase alte serii de publicații cu caracter periodic, „Progrese în fitochimie" vine să acopere un domeniu al biochimiei mai puțin abundent în lucrări de specialitate, biochimia vegetală. Alcătuirea primului volum dovedește o calitate însemnată a seriei, și anume înaltul ei nivel teoretic. Specialiștii de prestigiu tratează aici unsprezece din cele mai actuale probleme ale biochimiei vegetale.

Cîteva dintre lucrările prezentate au ca obiect diferitele substanțe prezente în plante. Rezumînd o literatură foarte bogată, aceste articole au în general o schemă de organizare comună: o parte descriptivă și o parte referitoare la metabolismul substanțelor respective. Se evidențiază, acolo unde este cazul, importanța fiziologică, ecologică și taxonomică a compușilor analizați. Citățm dintre articolele volumului: „Lipidele acilice și acizii grași în țesuturile fotosintetice" de B. W. Nichols și A. T. James, „Chimia cuticolelor vegetale" de P. Mazliak, „Progrese recente în chimia diterpenelor tetraciclice" de J. R. Hanson, „Substanțele izolate din licheni" de S. Huneck, „Alcaloizi propanici" de G. Fodor, „Constituenții chimici ai ferigelor" de G. Berti și F. Bottari.

Un grup de articole foarte interesante se referă la hormonii de creștere și importanța lor pentru metabolismul general al plantelor. În „Biosinteza giberelinelor", B. E. Cros se ocupă de calea de biosinteză a giberelinelor la *Giberella fujikuroi* și prezintă efectul inhibitorilor de creștere asupra acestui proces. A. Trewavas discută în „Corelația dintre hormonii de creștere vegetali și metabolismul acizilor nucleici" influența hormonilor asupra biochimismului acizilor nucleici.

În volum sînt tratate și cîteva probleme de importanță generală, ca: „Biochimia și mecanismele postulate ale fixării azotului" de R. W. Hardy și E. Knight jr. „Biochimia și fiziologia fitocromului" de M. Furuya.

O problemă foarte actuală — folosirea criteriilor biochimice în clasificarea plantelor — constituie obiectul articolului „Sistematica Biochimică".

Fiecare articol este însoțit de o bogată listă bibliografică. Volumul are un index de subiecte care ușurează consultarea materialului prezentat. După cum reiese din conținutul volumului recenzat, seria „Progrese în Fitochimie" se anunță ca o publicație deosebit de valoroasă pentru toți cercetătorii din domeniul biologiei vegetale.

Constanța Mușolan
Institutul de biochimie
al Academiei Republicii Socialiste România

Molecular Genetics (Genetica Moleculară), red. H. G. Wittmann și H. Schuster, Editura Springer, Berlin-Heidelberg-New York, 1968, 341 p.

Volumul conține lucrările simpozionului de „Genetică Moleculară" care a avut loc la Berlin (octombrie 1967), cu ocazia celei de a 4-a Conferințe a Societății Naturaliștilor și Medicilor Germani (Gesellschaft Deutscher Naturforscher und Ärzte).

Lucrările sînt grupate pe cinci secțiuni.

Prima secțiune, intitulată „Structura și funcțiile ribozomilor", cuprinde lucrările privind proteinele ribozomale, structura acestora, funcțiile unor subunități ribozomale în formarea legăturilor peptidice, precum și relațiile de complimentare și dominanță dintre subunitățile proteice.

Secțiunea a doua, „Codonii și biosinteza proteinelor", pe lîngă unele aspecte referitoare la controlul genetic al codonilor nonsens și recunoașterea acestora de către complexele amino-acil-ARN t, se referă în special la caracterizarea activității, structura și funcțiile celulare ale unor enzime implicate în sinteza proteică.

Cea de-a treia secțiune grupează 5 lucrări privind unele procese genetice importante, ca modificarea sau transformarea moleculelor de ADN, recombinarea indusă de lumina UV, atașarea și detașarea profagilor-— în special a fagilor P_2 și λ — și caracterizarea unor mutanți de Serratia Marcescens cu superactivitate sau lipsiți de activitate nucleazică.

Secțiunea următoare, intitulată „reglarea", cuprinde comunicările referitoare la interacțiunea inductor-represor, reglarea sintezei unor enzime, procesele de transcriere la bacteriile lipsite de aminoacizi etc.

A cincea secțiune, „Virușii", se referă la funcțiile genetice, caracterizarea și mecanismele de control ale unor infecții virale. Rezultatele din această secțiune sînt obținute cu fagii S_{13}, f1, M12, M 13, ZY-2, TMV etc.

Toate lucrările sînt amplu ilustrate prin grafice, fotografii și tabele, sînt însoțite de indicații bibliografice, precum și de discuțiile generate în cadrul simpozionului.

Datorită subiectelor tratate și rezultatelor prezentate, volumul este util nu numai pentru specialiștii care se preocupă de cercetarea acizilor nucleici, de biosinteza proteinelor sau de diferitele procese genetice; el este de un deosebit interes pentru toți aceia care doresc să cunoască progresele actuale din domeniul geneticii moleculare, unul din domeniile cele mai pasionante ale biologiei contemporane.

S. Vasu
Institutul de biochimie
al Academiei Republicii Socialiste România

J. CHAYEN, LUCILLE BITENSKY, R. BUTCHER, L. POULTER, — *A guide to practical histochemhistry* (Ghid de histochimie aplicată) Ed. Oliver and Boyd, University press, Aberdeen, Great Britain, 1969, XI, 261 p.

Acest mic manual de histochimie practică, scris clar și cu o concizie deosebită ce relevă bogata experiență a autorilor, descrie tehnici verificate, valoroase atît pentru elucidarea anumitor aspecte întîlnite în munca de cercetare științifică biologică, precum și pentru precizarea unor diagnostice de către medicul anatomo-patolog.

Compus din 7 părți, manualul dă pentru fiecare grup de tehnici sau uneori pentru fiecare problemă, noțiunile teoretice necesare pentru înțelegerea și valorificarea metodei expuse.

După ce în partea I se trec în revistă principalele metode de preparare a secțiunilor tisulare, în vederea abordării lor histochimice, în partea a II-a și a III-a se descriu tehnici mai noi de incubare a secțiunilor și de apreciere cantitativă a substanțelor cercetate, prin eluție,

colorare specifică şi citire fotometrică. Partea a IV-a tratează fixatorii şi coloranţii histologici uzuali care permit o interpretare corectă a modificărilor mai fine, evidenţiate histochimic. Ultimele două părţi sînt deosebit de importante şi cuprind majoritatea paginilor lucrării. În ele se expun tehnicile pentru evidenţierea componentelor tisulare majore (proteine, acizi nucleici, polizaharide, lipide) şi minore (substanţe anorganice şi autofluorescenţe, pigmenţi etc.) ca şi principalele metode histochimice de evidenţiere a enzimelor : fosfataze şi fosforilaze, esteraze, proteaze, sulfataze, oxidaze, dehidrogenaze etc.

Manualul este editat foarte îngrijit, iar legarea lui prin inele de plastic uşurează consultarea în timpul efectuării muncii de laborator. El va fi de un real ajutor tuturor chimiştilor, medicilor şi biologilor, care doresc să-şi aprofundeze munca de cercetare şi să îmbunătăţească diagnosticul, folosind tehnici histochimice relativ simple dar sigure.

Bibliografia bogată, cu numeroase lucrări recente, permite de asemeni informarea cititorilor asupra ultimelor tehnici apărute în acest domeniu.

Dr. *Rodica Lenkei*
Institutul de anatomie patologică
„Profesor Dr. Victor Babeş"

„Studii şi cercetări de biochimie" publică articole originale, de nivel ştiinţific superior, din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici, ca: Viaţa ştiinţifică, în care prin scurte note, sînt aduse la cunoştinţa cititorilor unele manifestări din domeniul biochimiei: congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experienţă între cercetătorii români şi cei străini etc. Recenzii în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în ţară şi peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugaţi să redacteze lucrările cît mai concis şi să şi le structureze în: introducere, material şi metode, rezultate şi discuţii, concluzii şi rezumat. Rezumatul şi titlul lucrării vor fi traduse în limba engleză. Articolele, notele şi recenziile se vor înainta în 3 exemplare, dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuş, pe hîrtie de calc. Tabelele şi ilustraţiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planşe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea aceloraşi date în text, tabele şi grafice. Explicaţia figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de iniţială. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanţelor internaţionale.

Autorii au dreptul la un număr de 50 de extrase, gratuit.

Responsabilitatea asupra conţinutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondenţa privind manuscrisele, schimbul de publicaţii etc. se va trimite pe adresa Comitetului de redacţie: str. Docenţilor nr. 20, Bucureşti, 63, Sectorul 1.

1970 JAN 7

LUCRĂRI APĂRUTE ÎN EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

R. PORTOCALĂ şi L. POPA, **Acizii ribonucleici celulari şi virali**, 1966, 25 × 17,50, 375 p., 8 pl., legat, anvelopă, 26 lei.

M. G. BALŞ, **Imunofluorescenţa şi aplicaţiile ei în inframicrobiologie**, 1966, 25 × 17,50, 285 p., 18 pl., legat, anvelopă, 27 lei.

ION CANTACUZINO, **Opere alese**, Œuvres choisies, 1965, 25 × 17,50, 687 p., legat, anvelopă, 44 lei.

* * * Omagiu acad. prof. RALUCA RIPAN, 1966, 30,50 × 21,50, 628 p. + 2 pl., legat, anvelopă, 50 lei.

La revue „Studii şi cercetări de biochimie" paraît 4 fois par an. Le prix d'un abonnement annuel est de $ 5 — FF. 25 — DM. 20. — Toute commande à l'étranger sera adressée à CARTIMEX, Boîte postale 134 — 135 Bucarest, Roumanie ou à ses représentants à l'étranger. En Roumanie, vous pourrez vous, abonner par les bureaux de poste ou chez votre facteur.

ST. CERC. BIOCHIM., TOMUL 12, NR. 4, P. 301 — 408, BUCUREŞTI, DECEMBRIE, 1969

I.P. Inf. — c. 3898

43810

Lei 20.—